

Aus der Medizinischen Klinik für Rheumatologie und Klinische Immunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Bilanzierung des lymphozytären Energie-  
stoffwechsels von Patienten mit entzündlich –  
rheumatischen Erkrankungen**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von  
Antje Kuhnke  
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix

Gutachter: 1. Prof. Dr. B. Manger  
2. Prof. Dr. M. Wehling  
3. PD Dr. F. Buttgereit

Datum der Promotion: 13.11. 2000

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
2	Material und Methoden .....	14
2.1	Probanden und Patienten.....	14
2.1.1	Probanden.....	14
2.1.2	Patienten mit einer entzündlich-rheumatischen Erkrankung .....	14
2.1.3	Einschätzung der Krankheitsaktivität entzündlich-rheumatischer Erkrankungen ....	17
2.1.4	Patienten mit einer aktiven Infektionskrankheit vor Therapiebeginn .....	25
2.2	Gewinnung der PBMC und Herstellung der Zellsuspension.....	27
2.3	Messung des Sauerstoffverbrauchs.....	28
2.3.1	Prinzip der Methode und Versuchsdurchführung .....	28
2.3.2	Concanavalin A und selektive Hemmstoffe.....	31
2.4	Semiquantitative PCR.....	32
2.4.1	Prinzip der Methode.....	32
2.4.2	Versuchsablauf.....	33
2.5	Statistische Auswertungen.....	40
3	Ergebnisse.....	41
3.1	PBMC-Energiestoffwechsel von Probanden im Vergleich zu Patienten mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen.....	41
3.1.1	Gesamtsauerstoffverbrauch der PBMC im Vergleich zwischen den Gruppen .....	41
3.1.2	Stimulierbarkeit der PBMC im Vergleich zwischen den Gruppen .....	44
3.1.3	Hauptenergieverbrauchende Prozesse in ruhenden PBMC.....	49
3.1.4	Hauptenergieverbrauchende Prozesse in mitogen-stimulierten PBMC .....	53
3.2	Glukokortikoideffekt auf die Expression der cAMP-spezifische PDE in humanen PBMC .....	61
3.2.1	Isolierung und Gelanalyse der Gesamt-RNA.....	61
3.2.2	Einfluß von Glukokortikoiden auf die cAMP-spezifische PDE .....	62
3.2.3	Spezifitätsnachweis .....	63

4	Diskussion .....	65
4.1	PBMC-Lymphozyten .....	65
4.2	Energiestoffwechsel in ruhenden PBMC .....	66
4.2.1	Gesamtsauerstoffverbrauch .....	66
4.2.2	Hauptenergieverbrauchende Prozesse .....	68
4.2.3	Therapeutische Glukokortikoidwirkungen auf den Gesamtsauerstoffverbrauch .....	73
4.2.4	Therapeutische Glukokortikoidwirkungen auf hauptenergieverbrauchende Prozesse .....	75
4.3	Energiestoffwechsel in stimulierten PBMC .....	76
4.3.1	Stimulierbarkeit ruhender PBMC .....	76
4.3.2	Hauptenergieverbrauchende Prozesse .....	79
4.3.3	Therapeutische Glukokortikoidwirkungen auf den Gesamtsauerstoffverbrauch .....	86
4.3.4	Therapeutische Glukokortikoidwirkungen auf hauptenergieverbrauchende Prozesse .....	87
4.4	In vitro - Glukokortikoideffekte auf die PDE - Expression .....	88
5	Klinische Relevanz der Ergebnisse .....	90
6	Zusammenfassung .....	91
7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....	93
8	Abkürzungsverzeichnis .....	95
9	Literaturverzeichnis .....	96

# **1 Einleitung**

Die adäquate Funktion einer Zelle ist von einer konstanten und ausreichenden Versorgung mit metabolischer Energie abhängig. Dies gilt allgemein für alle Zellen und trifft demzufolge auch für mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) zu, die in dieser Arbeit untersucht werden. Mit bis zu 90% der PBMC stellen die Lymphozyten die größte Fraktion dar. Der restliche Anteil besteht aus Granulozyten und Monozyten.

Lymphozyten spielen eine bedeutende Rolle für den Ablauf von Immunreaktionen. Normalerweise sind sie für die erworbene (adaptive) Immunität verantwortlich und dienen der Abwehr von Mikroorganismen. Desweiteren wurde erkannt, daß sie an der Bekämpfung tumorös entarteter Zellen beteiligt sind. [Janeway et al. 1997] Sie nehmen aber auch, infolge fehlgesteuerter Immunreaktionen, eine zentrale Stellung im Rahmen vieler entzündlich-rheumatischer Autoimmunerkrankungen ein. Die Lymphozyten benötigen die produzierte Energie zunächst einmal für ihre zelleigenen Funktionen, insbesondere für den Kationentransport und die Makromolekülsynthese. Diese Prozesse sind u.a. zur Regulierung des Zellvolumens und des Zellwachstums notwendig. Desweiteren haben Lymphozyten einen Energiebedarf für immunspezifische Aufgaben. Dazu zählen unter anderem der Energieverbrauch durch Zytokinese, Aktivierungsvorgänge, Antikörpersynthese oder auch Zytotoxizität. Granulozyten und Monozyten benötigen ebenfalls neben ihrem Energiebedarf für zelleigene Funktionen auch Energie für immunspezifische Aufgaben. Sie verbrauchen Energie für Migrationsprozesse, Phagozytose oder auch für die Antigenverarbeitung und -präsentation. [Buttgereit et al. 2000]

Die Arbeitshypothese lautete daher, daß der Energieverbrauch einer Zelle als Maß für deren Aktivität gilt. Es wird angenommen, daß diese Aussage vor allem für Lymphozyten zutrifft, da sie eine Zentralstellung im Ablauf von Immunreaktionen bei entzündlich-rheumatischen Erkrankungen spielen und deren Aktivitätsniveau stark veränderlich ist.

Die Energie wird hauptsächlich im Mitochondrium gebildet und der Zelle in Form von ATP bereitgestellt. ATP fungiert innerhalb der Zelle als Energieüberträger. Die Atmungskette, ein in den Mitochondrien lokalisiertes Multienzymsystem, katalysiert über hintereinander geschaltete Redoxprozesse den Aufbau eines elektrochemischen Gradienten, dessen Freie Enthalpie durch die ATP-Synthase zur Bildung von ATP genutzt wird. Die ATP-Menge reicht meist nur für wenige

Minuten aus, um den Energiebedarf zu decken. ATP wird damit ständig unter Energiefreisetzung zu ADP und Phosphat hydrolysiert und wieder regeneriert. [Voet et al. 1992]

Der Zelle stehen grundsätzlich zwei Möglichkeiten der Energiegewinnung zur Verfügung: Die Atmung und die Glykolyse. Der weitaus wichtigere Weg für die Zelle ist die Atmung, der oxidative Abbau von Substraten über die Atmungskette. Die dabei erzeugte Freie Enthalpie wird direkt der ATP-Synthase (ATPase) zugeführt, die aus ADP und Phosphat ATP bildet. Dieser Prozeß findet unter aeroben Bedingungen statt und wird Oxidative Phosphorylierung genannt. Bei der Veratmung von 1 Mol Glukose produziert die Zelle 38 Mol ATP. Da dieser Prozeß fest an die Synthese von ATP gebunden ist, spricht man auch von gekoppelter Atmung.

Die zweite Möglichkeit einer Zelle Energie zu gewinnen, ist die Glykolyse. Sie findet hauptsächlich unter anaeroben Bedingungen statt und liefert nur 2 Mol ATP pro Glukosemolekül. Infolgedessen hat sie eine deutlich geringere Effizienz. Desweiteren ist die Glykolyse im Normalgewebe unter aeroben Bedingungen durch die Atmung nahezu vollständig unterdrückt (Pasteur-Effekt). Sie läßt sich in vitro zusätzlich weitgehend verhindern, indem man dem Inkubationsmedium keine oder wenig Glukose und nur wenig Phosphat zusetzt. [Buttgereit et al. 1996; Voet et al. 1992]

Der gekoppelte Sauerstoffverbrauch läßt sich näherungsweise mit Oligomycin bestimmen. Oligomycin unterbricht die Übertragung der Freien Enthalpie des Elektronentransports auf die ATP-Synthase. Der ungekoppelte Sauerstoffverbrauch ist hauptsächlich vom Protonenleak verursacht. Er entspricht dem Protonenfluß im Mitochondrium, der unter Umgehung der ATP-Synthase erfolgt. Dieser Prozeß trägt damit nicht zur ATP-Bildung bei. [Buttgereit et al. 1996] Das Protonenleak wirkt an der Regulation der Wärmeproduktion, des zellulären Stoffwechsels, der Reduktion von schädlichen freien Radikalen und der Erzeugung von Redoxäquivalenten mit. Der extramitochondriale Sauerstoffverbrauch ist so gering, daß er vernachlässigt werden kann. [Rolfe et al. 1997]

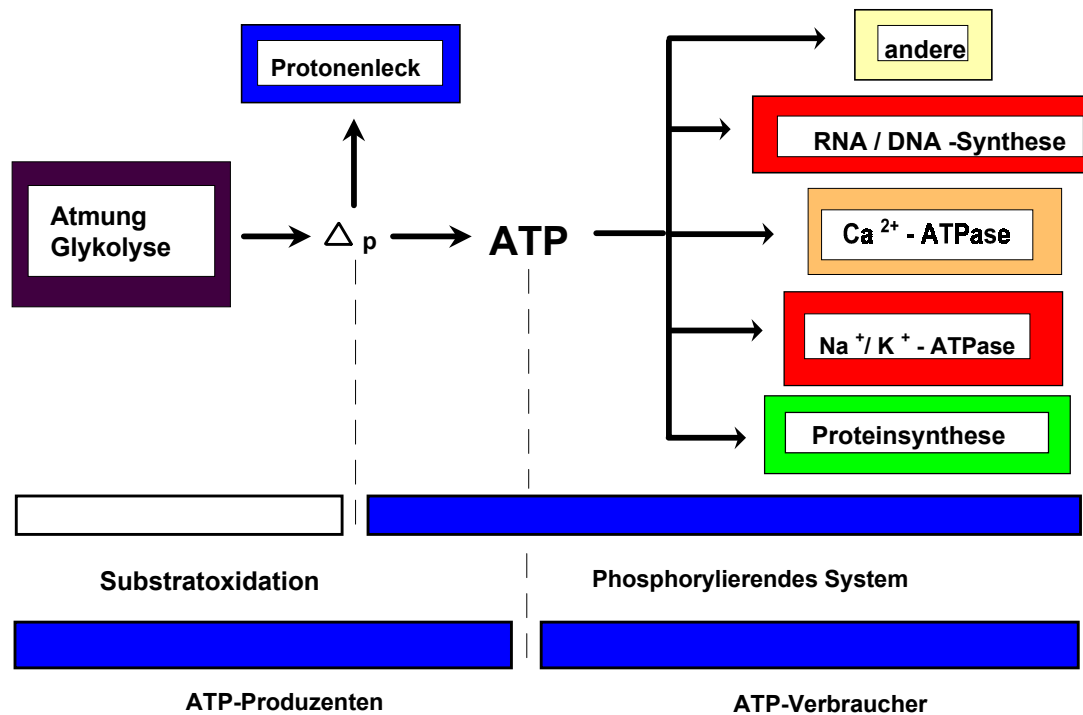


Abbildung 1: Der zelluläre Energiestoffwechsel [Buttgereit et al. 2000]

Eine Quantifizierung und (oder) Bilanzierung des zellulären Energiestoffwechsels erfolgte erstmals an Kaninchenretikulozyten [Siems et al. 1984], später dann auch an Ehrlich-Ascites-Tumorzellen der Maus [Müller et al. 1986], an Schweine- und Rattenlymphozyten [Buttgereit et al. 1991, 1992] und an humanen Zellen, die als periphere mononukleäre Zellen des Blutes (PBMC) aus Buffy coats zur Verfügung standen [Schmid et al. 2000].

Grundlage für die Bilanzierung war die Annahme, daß sich die im Medium befindlichen Zellen metabolisch im Fließgleichgewicht (steady state) und damit in einem energetisch stabilen Zustand befinden. Unter diesen Bedingungen wird in den Mitochondrien der PBMC nur so viel ATP produziert, wie für die Stoffwechselprozesse nötig ist. Die ATP-Bildung entspricht dem ATP-Verbrauch. Da wir unter unseren experimentellen Bedingungen die Glykolyse nahezu ausgeschlossen haben, errechnet sich die ATP-Bildung nur noch aus der gekoppelten Atmung. Das gebildete ATP wird durch verschiedenste Stoffwechselprozesse verbraucht. Der Umfang des Verbrauchs durch die einzelnen Prozesse kann direkt oder indirekt bestimmt werden. In dieser Arbeit wird die indirekte Methode verwendet. Dabei werden Hemmstoffe, die in selektiver Weise einzelne ATP-verbrauchende Prozesse blockieren, eingesetzt. Die daraus resultierende adäquate Verminderung der ATP-Bildung kann über die Verminderung des Sauerstoffverbrauchs durch die oxidative Phosphorylierung erfaßt werden. Die Messung des Sauerstoffverbrauchs

geschieht über kurze Inkubationszeiten im Minutenbereich amperometrisch mit der Clark-Elektrode.

In vorangegangenen Untersuchungen wurden in humanen PBMC aus Buffy coats die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase, die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, die Protein- und DNA/RNA-Synthese und das Protonenleak als hauptenergieverbrauchende Prozesse erkannt. [Schmid et al. 2000] Mit ihnen ließ sich in stimulierten PBMC ca. 63% des Energieverbrauchs spezifischen Prozessen zuordnen. Dies unterstreicht die essentielle Bedeutung für die Funktion und das Überleben von Zellen, hier insbesondere für Lymphozyten. Ausgehend von der Kenntnis der elementaren Bedeutung dieser Prozesse innerhalb des Energiestoffwechsels, werden die genannten ATP-verbrauchenden Prozesse auch in dieser Arbeit untersucht. Sie werden damit erstmalig an PBMC von Patienten mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen bestimmt und vergleichend zu denen von Probanden betrachtet.

Die Annahme, daß der Energieverbrauch einer Zelle deren Aktivität widerspiegelt, wurde zusätzlich experimentell durch Untersuchungen an Rattenthymozyten [Buttgereit et al. 1992] und später an humanen PBMC aus Buffy coats [Schmid et al. 2000] bestätigt. Beide Autoren zeigten, daß der Sauerstoffverbrauch ein Maß für die ATP-Bildung in ruhenden und stimulierten Lymphozyten ist. Es wurde der Sauerstoffverbrauch dieser Zellen unter ruhenden Bedingungen und nach mitogener Stimulation mit Con A verglichen. In den Arbeiten zeigte sich, daß nach Stimulation der Gesamtsauerstoffverbrauch deutlich zunahm. Um die sich dahinter verbergenden Prozesse zu identifizieren, wurde der Verbrauch des Sauerstoffs durch die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, Proteinsynthese und DNA/RNA-Synthese bestimmt. In diesen Arbeiten stellte sich heraus, daß die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und DNA/RNA-Synthese nach Stimulation überhaupt erst angeschaltet werden und die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase sowie die Proteinsynthese einen erhöhten absoluten und relativen Energieverbrauch hatten. Den bioenergetisch ruhenden Rattenthymozyten konnten etwa 50%, den stimulierten etwa 80%, des ATP-Verbrauchs zugeordnet werden. [Buttgereit et al. 1992]

Schlußfolgernd aus diesen Experimenten stellen sich folgende zentrale Fragen:

Sind die Ergebnisse auch auf PBMC entzündlich-rheumatisch erkrankter Patienten anwendbar? Reflektiert sich die Krankheit oder Krankheitsaktivität eines Patienten mit einer entzündlich-rheumatischen Erkrankung auf zellulärer Ebene in einer Änderung des Energiestoffwechsel der PBMC? Haben eventuell erfaßbare Unterschiede eine Bedeutung für die Diagnostik und Therapie dieser Erkrankungen?



Entzündlich-rheumatische Erkrankungen kommen mit einer Häufigkeit von 1-2% in der Bevölkerung vor. Zu ihnen gehören die relativ häufige Rheumatoide Arthritis und die Polymyalgia rheumatica, aber auch seltenere Erkrankungen, wie beispielsweise der Systemische Lupus Erythematoses, die Sklerodermie oder das Sjögren-Syndrom. Bei diesen Krankheiten handelt es sich um entzündliche Systemerkrankungen, die sich nicht nur am Bewegungsapparat, sondern auch an einer Vielzahl von Organen und Geweben manifestieren können. Bei der Entstehung dieser Erkrankungen spielen eine genetische Disposition und Autoimmunmechanismen eine große Rolle. Normalerweise reagiert ein Organismus nicht gegen seine eigenen Gewebsbestandteile, er ist ihnen gegenüber tolerant. Aber nach Durchbrechen dieser Toleranz, können infolge fehlgeleiteter Immunreaktionen Autoimmunerkrankungen entstehen. Die spezifisch adaptative Immunantwort wird gegen körpereigene Antigene ausgelöst und unterhalten. Autoimmunerkrankungen sind gekennzeichnet durch das Auftreten von Autoantikörper-produzierenden B-Lymphozyten und (oder) autoreaktiven zytotoxischen T-Lymphozyten.

Die Verläufe dieser Autoimmunerkrankungen sind in der Regel sehr variabel, vielgestaltig und nicht selten einzigartig für jeden Patienten. Es gibt Phasen, in denen sie ruhen, latent vorhanden sind oder auch sehr aktiv und aggressiv verlaufen. Die Krankheitsaktivität ist sehr veränderlich. Das bedeutet, daß sich eine Einschätzung der Prognose oftmals sehr schwierig gestaltet oder überhaupt nicht möglich ist. [Silman & Symmons et al. 1995] Dieser Tatbestand ist, durch die sich daraus ergebende Ungewißheit, für Patienten und Ärzte schwer zu handhaben. Damit kommt der Früherkennung einer beginnenden oder sich ändernden Krankheitsaktivität große Bedeutung zu. Das Behandlungsziel besteht in der frühen Intervention, um damit Schäden auto-aggressiver Reaktionen zu begrenzen. Die Einschätzung von Krankheitsaktivität erfolgt anhand von klinischen Beschwerden und laborchemischen Parametern entsprechend der Erkrankung. In beiden Fällen kann es Probleme geben. Zum einen sind die klinischen Beschwerden oft unspezifisch, zum anderen überlappen sich die Beschwerdebilder einzelner Erkrankungen, so daß sich nicht selten die genaue Diagnose erst im Krankheitsverlauf herauskristallisiert. Drittens mangelt es noch bei vielen Erkrankungen an spezifischen Parametern und diagnostischen Tests, die Krankheitsaktivität nachweisen. Laborchemisch wird nach unspezifischen und spezifischen Entzündungs- bzw. Erkrankungsparametern gesucht. Zu den spezifischen Parametern gehören u.a. Rheumafaktoren und spezielle Autoantikörper. Zu den unspezifischen Entzündungsparametern zählen die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), Akut-Phase-Proteine wie das C-reaktive Protein (CRP), Gerinnungs- und Komplement-Proteine, Alpha 1- und Alpha 2-Makroglobuline. Desweiteren sind Verschiebungen im Blutbild und der Serumeiweißelektrophorese relevant. Aus Erfahrungen weiß man, wie sich genannte Parameter bei bestimmten Krankheiten tendenziell ändern.

Für einige rheumatische Erkrankungen gibt es inzwischen international anerkannte Kriterien zur Einschätzung von Schwere und Krankheitsaktivität, z.B. für den Systemischen Lupus Erythematoses den ECLAM-Score (European consensus lupus activity measurement). [Vitali et al. 1992] Solche Kriterien existieren aber nicht für alle rheumatischen Erkrankungen, so daß bei selteneren Erkrankungen die Einordnung uneinheitlich und schwierig bleibt.

All dies zeigt, wie problematisch es sein kann, Krankheitsaktivität zu erkennen, einzuschätzen und von nicht autoimmun bedingten Beschwerden, wie z.B. degenerativen Veränderungen, abzugrenzen.

### Ableitung der Aufgabenstellung

Ausgehend von den genannten Tatsachen werden in dieser Arbeit erstmals folgende Fragen gestellt:

Treffen die Aussagen zur Zellaktivität, die an ruhenden und stimulierten Rattenthymozyten sowie humanen PBMC aus Buffy coats gewonnen wurden, ebenfalls auf aus Vollblut einer gesunden Population frisch präparierter PBMC zu?

Besteht eine Korrelation bioenergetischer Daten zu physiologischen und klinischen Zuständen?

Sind die Ergebnisse ruhender Lymphozyten mit denen aus Vollblut gesunder Probanden vergleichbar?

Sind die Ergebnisse stimulierter Lymphozyten mit denen aus Vollblut entzündlich-rheumatisch erkrankter Patienten vergleichbar?

Unterscheidet sich das bioenergetische Profil von PBMC einer gesunden Population von dem der Patienten mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen?

Unterscheidet sich das bioenergetische Profil im Gesamtsauerstoffverbrauch, in der Stimulierbarkeit und (oder) hinsichtlich der sauerstoffverbrauchenden Prozesse?

Welchen Einfluß hat eine Glukokortikoidtherapie?

Zur Beantwortung dieser Fragen haben wir die Versuchsgruppen wie folgt geplant:

1. eine Gruppe gesunder Probanden mit einem intakten Immunsystem,
2. eine Gruppe von Patienten mit einer entzündlich-rheumatischen Autoimmunerkrankung, die derzeit inaktiv ist,
3. eine Gruppe von Patienten, mit einer entzündlich-rheumatischen Autoimmunerkrankung, die derzeit aktiv ist, mit Untersuchungen sowohl vor als auch nach Therapiebeginn, und
4. als Kontrollgruppe, eine Gruppe von Patienten ohne bekannte Autoimmunerkrankung, aber mit einer aktiven Infektionskrankheit vor Therapiebeginn.

Bei den ersten zwei Gruppen nehmen wir ein nicht-aktiviertes Immunsystem an, bei den letzteren vermuten wir ein aktiviertes. Änderungen im Energiestoffwechsel entzündlich-rheumatisch erkrankter Patienten müßten durch fehlgeleitete Immunprozesse ausgelöst sein. Dagegen dürften sie bei Patienten mit einer Infektionskrankheit aus Prozessen zur gezielten Abwehr der entsprechenden Infektion resultieren. Wir vermuten daher, daß es Unterschiede im Energiestoffwechsel der PBMC beider Gruppen geben könnte. Durch die vergleichende Betrachtung beider Gruppen sollen mögliche Unterschiede herausgearbeitet werden.

Zusammenfassend formuliert soll die vorliegende Arbeit feststellen, ob sich aus den Untersuchungen charakteristische Veränderungen im Energiestoffwechsel aus Vollblut präparierter PBMC von Patienten erkennen lassen, die in Abhängigkeit vom Aktivitätsniveau entzündlich-rheumatischer Erkrankungen auftreten.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit Untersuchungen des Einflusses von Glukokortikoiden auf die Expression der cAMP-spezifischen PDE in humanen PBMC. Glukokortikoide wirken auf das Immunsystem antiinflammatorisch, immunsuppressiv, antiallergisch und antiproliferativ. [Hatz et al. 1998] Man geht davon aus, daß Glukokortikoide ihre Wirkungen über drei verschiedene Mechanismen vermitteln. [Buttgereit et al. 1998; Wehling et al. 1997] Dazu zählen die sehr gut erforschten genomische Wirkungen. Hierbei durchwandern die Glukokortikoide als lipophile Substanzen die Zellmembran und binden an einen zytosolischen Glukokortikoidrezeptor. Nach Bindung des Glukokortikoid-Rezeptorkomplexes an spezifische Stellen der DNA, kommt es zur Beeinflussung der Transkriptionsrate verschiedener Proteine. Aus dieser

resultiert letztendlich eine Expressionssteigerung, aber auch Inhibierung spezifischer Gene. Dabei kommt es z.B. zur gesteigerten Synthese des antiinflammatorisch wirkenden Lipocortin-1 [Goulding et al. 1993], zur verminderten Expression von z.B. gelenkzerstörenden Enzymen wie Kollagenase und Stromelysin oder proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF- $\alpha$ . [Hatz et al. 1998] Darüber hinaus haben Glukokortikoide nicht-genomische Wirkungen, die man in spezifische und unspezifische unterteilt. Die nicht-genomischen Wirkungen entstehen ohne primäre Einbeziehung des Genoms, d.h. ohne primäre Beeinflussung der Transkription und Translation. [Schmid et al. 2000] Man geht davon aus, daß die innerhalb von wenigen Minuten auftretenden spezifischen nicht-genomischen Wirkungen über membranständige Glukokortikoidrezeptoren vermittelt werden. Auf die Existenz dieser Rezeptoren weisen verschiedene Befunde hin. [Moore et al. 1994; Trueba et al. 1991; Edwardson et al. 1974] Dagegen treten die unspezifischen nicht-genomischen Wirkungen innerhalb von Sekunden bei höheren Glukokortikoiddosen auf. Bei ihnen kommt es, vermutlich über eine Interkalierung der Glukokortikoide in der Zellmembran, zu einem veränderten Kationenfluß und damit zur Beeinflussung des Energiestoffwechsels. [Buttgereit et al. 1997, 1993]

Neben der Beeinflussung der Zellmembranen läßt es sich nicht ausschließen, daß es noch andere Wirkungsmechanismen der Glukokortikoide gibt, die hemmend in die antigen-induzierte intrazelluläre Signalkaskade eingreifen und damit eine Aktivierung der Zellen verhindern. Es konnte gezeigt werden, daß in Anwesenheit von Glukokortikoiden die Konzentration von zyklischen 3',5'-Adenosinmonophosphates (cAMP) innerhalb weniger Minuten in ruhenden Zellen ansteigt. [Wertenauer 2000] Zyklisches AMP spielt als second messenger eine zentrale Rolle in der hormonalen Regulation des Zellstoffwechsels. Es wird unter Einwirkung der Adenylatzyklase gebildet und durch eine spezifische Phosphodiesterase (PDE) abgebaut. Intrazelluläres cAMP ist ein bedeutender Regulator lymphozytärer Aktivität. [Banner et al. 1999; Ekholm et al. 1999; Seth et al. 1997] Mehrfach wurde für cAMP-erhöhende Substanzen ein immunsuppressives Potential nachgewiesen. Eine erhöhte cAMP-Konzentration kann aus einer Aktivierung der Adenylatzyklase und (oder) aus einer Hemmung der cAMP abbauenden PDE resultieren. [Banner et al. 1999; Hermsdorf et al. 1999; Conti et al. 1995] Das erhöhte cAMP könnte seinerseits die rezeptorvermittelte Signalkaskade blockieren und den Anstieg von Inositoltriphosphat und der intrazellulären Calciumkonzentration hemmen. [Eyster et al. 1998; Tamir et al. 1996; Conti et al. 1995] Bis heute ist der Zusammenhang, der zwischen einer Erhöhung des cAMP und Inkubation mit Glukokortikoiden besteht, ungeklärt. Es gibt aber Hinweise darauf, daß ein verminderter

Abbau von cAMP durch die Phosphodiesterase ursächlich ist. [Hermsdorf et al. 1999; Yingling et al. 1994; Elks et al. 1984]

Ziel dieser Arbeit ist es, mittels einer semiquantitativen PCR den Einfluß von Glukokortikoiden auf die Expression der cAMP-spezifischen PDE in PBMC zu untersuchen. Dazu wird die Menge an RNA-Sequenzen, die für die cAMP-spezifische PDE kodieren, vor und nach Inkubation mit einem Glukokortikoid bestimmt und verglichen.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 *Probanden und Patienten***

#### **2.1.1 Probanden**

Nach Stellung eines Antrages und Zustimmung der Ethikkommission zu Untersuchungen aller genannten Gruppen, wurden zunächst insgesamt 30 gesunde Probanden untersucht. Das Ziel bestand in der erstmaligen Ermittlung von Normalwerten bzw. -bereichen für Sauerstoffverbrauch, Stimulierbarkeit und Umfang der sauerstoffverbrauchenden Prozesse in PBMC.

Dazu wurden jeweils 15 weibliche und 15 männliche Probanden im Alter zwischen 20-30 Jahren ausgewählt. Das Durchschnittsalter betrug 24 Jahre. Dabei handelte es sich hauptsächlich um gesunde Studenten und junge Mitarbeiter des Universitätsklinikums Charité. Sie wurden aufgeklärt und hatten ihr Einverständnis zur Blutentnahme gegeben. Es wurden nur solche Probanden in die Untersuchungen aufgenommen, deren subjektives Wohlbefinden zum Zeitpunkt der Blutentnahme nicht eingeschränkt war. Desweiteren lagen zu diesem Zeitpunkt keine Infekte oder andere bekannte akute und chronische Erkrankungen vor.

#### **2.1.2 Patienten mit einer entzündlich-rheumatischen Erkrankung**

Die Patienten wurden in zwei Gruppen, bestehend aus Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung und Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung, eingeteilt. Nach Erhebung der Anamnese und körperlicher Untersuchung, erfolgte die Blutentnahme für Routineuntersuchungen und für Untersuchungen zum Sauerstoffverbrauch der PBMC. Alle Patienten wurden zuvor aufgeklärt und hatten ihre Einwilligung dazu gegeben.

#### 2.1.2.1 Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung

Das Patientenkollektiv rekrutierte sich aus Patienten, die in der hiesigen rheumatologischen Polikliniksprechstunde mit ihrer bekannten Erkrankung in regelmäßiger Betreuung waren. Entsprechend der Gruppenplanung wurden nur solche Patienten ausgewählt, die klinisch keine oder nur geringe Beschwerden aufwiesen und unauffällige oder nur grenzwertig erhöhte laborchemische Entzündungsparameter hatten. Außerdem waren die Patienten dieser Gruppe mit einer niedrigen Glukokortikoiddosis von maximal 20 mg Prednisolon pro Tag eingestellt.

Diese Gruppe setzte sich insgesamt aus 16 Patienten zusammen, 9 weiblichen und 7 männlichen. Das durchschnittliche Alter betrug in dieser Gruppe 56 Jahre. Das Krankheitsspektrum war sehr unterschiedlich. Fünf Patienten litten an einer Rheumatoiden Arthritis, 4 an einer Polymyalgia Rheumatica / Arteriitis temporalis, 3 an einem Systemischen Lupus Erythematoses und je ein Patient an einer Sklerodermie, einem Diskoiden Lupus Erythematoses, einem RS<sub>3</sub>PE-Syndrom und an einem Morbus Cogan.

#### 2.1.2.2 Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung

Die Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung wurden stationär in der Rheumatologischen Abteilung der Charité behandelt. Sie kamen zur Therapie eines Krankheitschubes ihrer zum Teil lange bekannten oder erstmals diagnostizierten entzündlich-rheumatischen Erkrankung. Dieses Patientenkollektiv war gekennzeichnet durch eine erkrankungsbedingte klinische Symptomatik und laborchemisch erhöhte Entzündungsparameter. Desweiteren waren sie mit niedrig dosierten Glukokortikoiden oder überhaupt nicht medikamentös vorbehandelt.

Für unsere Untersuchungen wurden nur Patienten mit einer gesicherten entzündlich-rheumatischen Erkrankung berücksichtigt, bei denen vor und nach Einleitung einer mittelhoch ( $\leq 1\text{mg Prednisolonäquivalent/kg/Tag}$ ) bis hoch dosierten ( $\geq 1\text{mg Prednisolonäquivalent/kg/Tag}$ ) Glukokortikoidtherapie Blut entnommen werden konnte. Die Diagnosestellung und Bestimmung der Krankheitsaktivität erfolgte nach international anerkannten Kriterien, welche in diesem Kapitel im Detail besprochen werden.

Es wurde zunächst das Blut von 21 Patienten untersucht. Letztendlich erfüllten nur 12 Patienten die oben genannten Kriterien und konnten daher in die Auswertung einbezogen werden. Alle 12 Patienten waren weiblich. Das Patientenalter dieser Gruppe betrug im Durchschnitt 47 Jahre. Die

Blutentnahme erfolgte vor Behandlung und im Durchschnitt vier bis fünf Tage nach deren Beginn. Zu diesem Zeitpunkt war bei allen Patienten schon eine deutliche Zustandsbesserung eingetreten. Das Krankheitsspektrum war ähnlich wie in der Gruppe von Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung. Drei Patienten litten an einer Rheumatoiden Arthritis, 3 an einem Systemischen Lupus Erythematoses, 2 an einer Polymyalgia Rheumatica / Arteriitis temporalis, 2 an einem Sjögren-Syndrom und je eine Patientin an einer Mischkollagenose und an einem Morbus Behçet. Die Patienten konnten in drei Therapiegruppen eingeteilt werden. Vier Patienten wurden initial mit 30 -  $\leq$  50 mg und 5 Patienten mit 50 -  $\leq$  100 mg Prednisolon pro Tag behandelt. Weitere 3 Patienten erhielten als Initialtherapie 250 -  $\leq$  500 mg Methylprednisolon pro Tag. In der folgenden Tabelle sind zusammenfassend die Anzahl und Diagnosen der Patienten mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen dargestellt.

Tabelle 1: Diagnosen und Anzahl der untersuchten Patienten mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen

<b>2.1.2.2.1 Diagnose</b>	<b>2.1.2.2.1.1 Anzahl der untersuchten Patienten</b>	
	inaktiv	aktiv
Rheumatoide Arthritis	5	3
SLE	3	3
Polymyalgia Rheumatica / Arteriitis Temporalis	4	2
Sklerodermie	1	
Diskoider Lupus Erythematoses	1	
RS <sub>3</sub> PE-Syndrom	1	
Cogan-Syndrom	1	
Mischkollagenose		1
Sjögren-Syndrom		2
Morbus Behçet		1



## 2.1.3 Einschätzung der Krankheitsaktivität entzündlich-rheumatischer Erkrankungen

### 2.1.3.1 Rheumatoide Arthritis (RA)

Die Rheumatoide Arthritis ist eine meist schubweise oder kontinuierlich progredient verlaufende entzündlich-systemische Bindegewebserkrankung mit Hauptmanifestationen an den Gelenken, die durch Arthritis, Synovialitis, Bursitis und Tendovaginitis charakterisiert ist. In der Regel geht sie mit allgemeinen Krankheitszeichen einher und kann auch zu extraartikulären Organmanifestationen führen. [Lohr & Keppler et al. 1999]

Die Diagnose der RA wurde anhand der revidierten Kriterien des American College of Rheumatology (ARA-Kriterien) von 1987 gestellt. [Arnett et al. 1987] Demnach müssen vier von diesen sieben Kriterien erfüllt sein und die Kriterien eins bis vier für mindestens sechs Wochen vorliegen.

1. Morgensteifigkeit der Gelenke von mindestens einer Stunde Dauer
2. Arthritis von 3 oder mehr Gelenkbereichen (Weichteilschwellung oder Erguß)
3. Arthritis der Gelenke an Hand- und Fingergelenken (Schmerzen und Schwellungen von Handwurzel-, Fingergrund- oder Mittelgelenken)
4. Symmetrische Arthritis (gleichzeitiger Befall desselben Gelenkbereiches beider Körperhälften)
5. Subkutane Rheumaknoten
6. Rheumafaktoren im Serum nachweisbar
7. Radiologische Veränderungen (gelenknahe Osteoporose und (oder) Erosionen)

Indikation für den Beginn oder die Intensivierung der Glukokortikoidtherapie war eine erhöhte Aktivität der Erkrankung. Darunter wird das Vorhandensein von mehr als drei geschwollenen Gelenken, Morgensteifigkeit von mehr als 45 Minuten und eine Erhöhung des C-reaktiven Proteins oder der Blutsenkung verstanden. [Silman & Symmons et al. 1995]

### 2.1.3.2 Systemischer Lupus Erythematoses (SLE)

Der systemische Lupus erythematoses ist eine Systemerkrankung mit oligo- oder multisymptomatischen Verlauf, die das Bindegewebe und Gefäßsystem betrifft.

Die Diagnose des SLE wurde anhand der Kriterien des American College of Rheumatology (ACR) von 1982 gestellt und liegt bei Erfüllung von vier oder mehr Kriterien vor. [Tan et al. 1982]

1. Schmetterlingserythem (Rötung über Wangen- und Nasenrücken)
2. diskoider Lupus erythematoses (erhabene, gerötete hyperkeratotische Effloreszenzen mit Schuppenbildung)
3. Photosensibilität
4. Orale oder nasopharyngeale Ulzerationen
5. Nichterosive Arthritis an mehr als zwei peripheren Gelenken
6. Polyserositis
7. Nierenbeteiligung (Glomerulonephritis, Nephrotisches Syndrom, renaler Hypertonus)
8. ZNS- Beteiligung (u.a. Krampfanfälle, Polyneuropathien, Psychosen)
9. Hämatologische Beteiligung (Anämie, Leukopenie, Lymphopenie, Thrombopenie)
10. Immunologische Befunde (Antikörper gegen native DNA, gegen Sm-Nukleoprotein, Phospholipidantikörper)
11. Antinukleäre Antikörper

Die klinische Aktivität wurde unter Benutzung der ECLAM-Kriterien (European consensus of Lupus activity measurement) beurteilt. [Vitali et al. 1992] Zu diesen Kriterien gehören generalisierte Manifestationen (Fieber, Müdigkeit), Gelenkmanifestationen, aktive oder latente Haut- und Schleimhautmanifestationen, Myositis, Perikarditis, Manifestation an Lunge, Intestinum, Nervensystem, Niere, hämatologische Veränderungen (Anämie, Leuko-, und Thrombopenie), erhöhte BSG und Hypokomplementämie (manifest oder in Entwicklung). Den einzelnen Kriterien werden je nach Wertigkeit 0,5 bis maximal zwei Punkte zugeordnet. In unserer Untersuchung wurde eine erhöhte Krankheitsaktivität angenommen, wenn der ECLAM-Score mindestens sechs Punkte betrug.

Als inaktiv konnten in unserer Studie Patienten eingeordnet werden, wenn sie in den letzten drei Monaten keine Aktivität zeigten und einen ECLAM-Score  $\leq 3$  aufwiesen, wobei moderate Änderungen der Laborparameter erlaubt waren. Die Patienten erhielten in der Regel eine begleitende Therapie mit einer Glukokortikoiddosis  $< 15$  mg Prednisolonäquivalent und anderen Immunsuppressiva.

Als Indikation für den Beginn oder die Intensivierung einer Therapie mit Glukokortikoiden wurde sowohl die klinische Aktivität (Arthritis, Serositis, Myositis, Vaskulitis, Fieber und andere Manifestationen) als auch die laborchemische Aktivität (Anstieg des DNA-Antikörper-Titers, signifikante Erniedrigung der C3 und C4-Konzentrationen, Proteinurie, Leukopenie und andere Parameter) angesehen. [Lohr & Keppler et al. 1999; Silman & Symmons et al. 1995]

Der *Diskoide Lupus Erythematoses* stellt die kutane Verlaufsform des SLE dar. Er befällt zu meist die Haut des Gesichts, des Kopfes und der Hände. Ein disseminierter Hautbefall ist eher selten. Der Diskoide LE ist gekennzeichnet durch münzgroße, scharf begrenzte Herde mit zentralen Hyperkeratosen. Die Abheilung erfolgt meist unter narbiger Atrophie mit Hyper- oder Depigmentierung. Die Diagnose wird anhand des klinisch-histologischen Bildes gestellt (herdförmige perivaskuläre entzündliche Infiltrate, Epidermisatrophie, Basalzelldegeneration, Hyperkeratose). Weiterhin ist ein positiver DIF-Test (bandförmiger Nachweis von Immunglobulinen und Komplementfaktoren in der Basalmembranzone) typisch. Allgemeine laborchemische Parameter sind in der Regel unauffällig. In bis zu 5% der Fälle geht die Erkrankung im Verlauf in einen SLE über. [Rassner et al. 1992]

### 2.1.3.3 Polymyalgia arteriitica

Die Polymyalgia rheumatica und die Arteriitis temporalis werden, obwohl sie in etwa der Hälfte der Fälle klinisch voneinander unterscheidbare Symptome aufweisen, als Entität unter dem Begriff Polymyalgia arteriitica zusammengefaßt. [Lohr & Keppler et al. 1999]

Die *Polymyalgia rheumatica* ist eine entzündliche Multiorganerkrankung. Sie ist gekennzeichnet durch heftige Muskelschmerzen im Schulter- und Beckengürtelbereich, Morgensteifigkeit und allgemeine Krankheitszeichen. Sie tritt in der Regel jenseits des 50. Lebensjahres auf und zeigt in ca. 50% der Fälle eine Assoziation mit der Arteriitis temporalis.

Die Diagnosekriterien für die Polymyalgia rheumatica sind Muskelschmerzen (Schultergürtel, Oberschenkel), starkes allgemeines Krankheitsgefühl, akuter Krankheitsbeginn (innerhalb von zwei Wochen), Gewichtsverlust, deutliche BSG-Beschleunigung ( $> 40$  mm in der ersten Stunde) sowie beidseitiger Oberarmdruckschmerz. Eine Polymyalgia rheumatica wird angenommen, wenn drei Kriterien positiv oder ein Kriterium zusammen mit einer Arteriitis temporalis auftritt. [Bird et al. 1979]

Bei der *Arteriitis temporalis* handelt es sich um eine Vaskulitis im Versorgungsbereich der Arteria carotis. Sie ist häufig durch einen unspezifischen, schleichenden Krankheitsbeginn mit Fieber, Abgeschlagenheit, Depression und Gewichtsverlust gekennzeichnet. In der Regel tritt sie wie die Polymyalgia rheumatica jenseits des 50. Lebensjahr auf. Zu den Symptomen gehören Kopfschmerzen unterschiedlicher Lokalisation, charakteristische Dysästhesien der Kopfhaut, Berührungsempfindlichkeit und verminderte Pulsation der Temporalarterien sowie Sehstörungen bis hin zur Kieferklaudikation. In einigen Fällen werden auch die Aorta und ihre großen Äste befallen. Die histologische Sicherung erfolgt mittels Arterienbiopsie durch den Nachweis einer Infiltration mit mononukleären Zellen, z.T. mit einer granulomatösen Entzündung und mehrkernigen Riesenzellen.

Die Diagnose wird anhand der Kriterien nach Hunder et al. [1990] gestellt. Hierzu gehören ein positiver bioptischer Befund, typische Kopfschmerzen, Berührungsempfindlichkeit der Temporalarterie, Alter über 50 Jahren und eine BSG  $> 50$  mm in der ersten Stunde. Drei Kriterien müssen mindestens erfüllt sein. Schon bei begründetem Verdacht muß eine hoch dosierte Glukokortikoidtherapie eingeleitet werden. Später werden die Patienten langfristig auf eine Erhaltungsdosis entsprechend dem klinischen Befund und den Entzündungsparametern eingestellt.

Die Einschätzung der Aktivität der Polymyalgia arteriitica erfolgt anhand der klinischen Symptomatik und im Zusammenhang mit den laborchemischen Entzündungsparametern. Es existieren keine standardisierten Scores. Nützliche Parameter zur Aktivitätsbeurteilung sind eine erhöhte BSG, CRP, Plasmaviskosität und  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin. Desweiteren korrelieren erhöhte Mengen von löslichen IL-6 und IL-2 Rezeptor mit der Krankheitsaktivität. [Silman & Symmons et al. 1995]

#### *2.1.3.4 Morbus Behçet*

Der Morbus Behçet ist eine systemische Vaskulitis der kleinen Gefäße und tritt bevorzugt bei Mittelmeeranwohnern und Japanern auf. Die Erkrankung ist durch schmerzhafte orale und genitale Ulzerationen in Kombination mit Krankheitsmanifestationen an den Augen und Gelenken gekennzeichnet. Weiterhin kann es zu zerebral-nervösen Symptomen, Thrombosen und gastrointestinalen Affektionen kommen.

Die Diagnose wird anhand der Kriterien der International Study Group (ISG) for Behçet's Disease gestellt. [ISG for Behçet's Disease 1990] Diese Erkrankung liegt bei rezidivierenden oralen Aphthen ( $\geq 3$  mal im Jahr) mit zusätzlich 2 der nachfolgenden Kriterien vor: Genitale Ulzerationen, Augenläsionen (Uveitis, Iritis mit Hypopyon und (oder) Retinitis), Hautläsionen (Erythema nodosum, Follikulitis, sterile Pusteln) und ein positiver Pathergietest.

Die Einschätzung der Aktivität erfolgt anhand der Ausprägung klinischer Manifestationen an den einzelnen Organsystemen. Es gibt derzeit keine geeigneten Laborparameter, die gut mit der Krankheitsaktivität korrelieren. Zumeist zeigt sich nur eine geringe Erhöhung der Entzündungsparameter. Bei systemischen Manifestationen kommen Glukokortikoide in Kombination mit anderen Immunsuppressiva zum Einsatz. [Silman & Symmons et al. 1995]

#### 2.1.3.5 Progressive systemische Sklerose

Die Progressive Systemische Sklerose, auch Sklerodermie genannt, ist eine Systemerkrankung des Bindegewebes. Es kommt zur Kollagenanhäufung und Fibrose von Haut und inneren Organen, welche von einer obliterierenden Angiopathie begleitet wird.

Die Diagnose wird anhand der ARA-Kriterien für die Sklerodermie (1980) gestellt. [Masi et al. 1980] Sie ist anzunehmen, wenn entweder das Hauptkriterium oder mindestens zwei der Nebenkriterien erfüllt sind. Als Hauptkriterium gilt die symmetrische Sklerodermie proximal der MCP (Metakarpalphalangen) oder MTP (Metatarsalphalangen). Zu den Nebenkriterien zählen grubchenförmige Narben oder Substanzverlust der distalen Finger- bzw. Zehenweichteile, Sklerodaktylie und basale Lungenfibrose.

In 90% der Fälle sind ANA-Antikörper nachweisbar. Die limitierte Form, das CREST-Syndrom, ist durch Calcinosis cutis, Raynaudsymptomatik, ösophageale Motilitätsstörungen, Sklerodaktylie und Teleangiektasien charakterisiert. Bei dieser können in 50% der Fälle ACA (Anti-Centromer-AK) nachgewiesen werden. Bei der diffusen Verlaufsform mit Beteiligung innerer Organe gelingt in 40% der Fälle der Nachweis von Anti-SCL 70. Die Einschätzung der Krankheitsaktivität erfolgt anhand der klinischen Symptomatik und der allgemeinen laborchemischen Entzündungsparameter. Es existieren bisher keine standardisierten Scores. [Silman & Symmons et al. 1995] Medsger et al. [1999] veröffentlichte vor kurzem Kriterien, die als Grundlage zur Entwicklung eines Aktivitäts-Indexes dienen sollen.

#### 2.1.3.6 Mischkollagenose (MCTD)

Die Mischkollagenose (mixed connective tissue disease; Sharp-Syndrom) ist ein rheumatisches Erkrankungsbild mit sich überlagernden Symptomen von einem systemischen Lupus erythematoses, einer progressiven systemischen Sklerose und einer Dermato- oder Polymyositis. Bisher fehlen zur Diagnosestellung allgemein akzeptierte Klassifikationssysteme. Richtungsweisend sind vor allem die Anamnese und der körperliche Untersuchungsbefund mit überlappenden Symptomen der genannten systemischen Bindegewebserkrankungen, rheumatoiden Arthritis sowie serologische Befunde. [Miehle et al. 2000] Nach Venables et al. [1996] gehören zu den häufigsten Symptomen Arthralgien / Arthritiden (meist symmetrischer und überwiegend Befall der kleinen Fingergelenke), das Raynaud-Phänomen, Ösophagusmotilitätsstörungen, Lungenveränderungen (z.B. trockene Pleuritis, fibrosierende Alveolitis), Handschwellungen, Myositis,

Lymphadenopathie, Hautveränderungen (z.B. Ulzerationen, Sklerodaktylie), Serositiden, Fieber und andere. Serologisch ist der hohtitrige Nachweis von Antikörpern gegen U1-small nuclear ribonucleoprotein (U1-snRNP) stark wegweisend. Weiterhin können antinukleäre Antikörper (ANA), ssDNA- und dsDNA-Antikörper und Antikörper gegen verschiedene extrahierbare nukleäre Antigene (ENA) sowie Rheumafaktoren vorkommen. Unspezifische serologische Befunde sind eine beschleunigte BSG, Hypergammaglobulinämie und Leukopenie mit im Vordergrund stehender Lymphopenie.

Die Einschätzung der Krankheitsaktivität erfolgt anhand der klinischen Symptomatik der einzelnen Erkrankungskomponenten und mit Hilfe von allgemeinen laborchemischen Entzündungsparametern. Es existieren keine standardisierten Scores. [Miehle et al. 2000]

#### 2.1.3.7 Sjögren - Syndrom

Das Sjögren-Syndrom ist eine chronische Systemerkrankung die durch Trockenheit des Mundes, der Augen und anderer Schleimhäute gekennzeichnet ist.

Die Diagnose wird anhand von Kriterien gestellt, die 1993 durch eine europäische Arbeitsgruppe erarbeitet worden sind. [Vitali et al. 1993] Von den sechs erstellten Kriterien müssen mindestens vier erfüllt sein. Zu diesen gehören das subjektive Gefühl von trockenen Augen, subjektive Beschwerden aufgrund eines trockenen Mundes, nachweisbare Dysfunktion der Tränendrüsen (Schirmer-Test), der Speicheldrüsen, eine positive Lippenbiopsie mit Nachweis von lymphozytärer Infiltration und der Nachweis von Autoantikörpern (Ro und La).

Die Einschätzung der Krankheitsaktivität erfolgt anhand der Ausprägung der klinischen Symptomatik und laborchemischen Parametern. Ein Score existiert nicht. [Silman & Symmons et al. 1995] Nach Oxholm et al. [1992] unterscheidet man primäre und sekundäre Aktivitätsmarker. Primäre Aktivitätsmarker reflektieren direkt den Ablauf des Entzündungsprozesses in den Drüsen und befallenen Organen. Es werden Substanzen produziert, die im Blut und Sekreten nachweisbar sind. Dazu gehören Immunglobuline, Autoantikörper, Immunkomplexe,  $\beta_2$ -Mikroglobulin, löslicher IL-2 Rezeptor oder auch Komplementfaktoren. Histopathologisch gelingt der direkte Nachweis einer lymphozytärer Infiltration in den Drüsen. Sekundäre Aktivitätsmarker spiegeln den resultierenden klinischen Schaden der betroffenen Organe wider. Bei Befall der Tränendrüse gelingt beispielsweise der Nachweis eines pathologischen Schirmer-Tests durch die verminderte Produktion von Tränenflüssigkeit.

#### 2.1.3.8 Cogan-Syndrom

Der Morbus Cogan ist eine seltene chronisch entzündliche Erkrankung, die durch eine interstitielle Keratitis, progrediente Innenohrschwerhörigkeit, Schwindel und Ohrgeräusche gekennzeichnet ist. Der Entzündungsprozeß kann sich zusätzlich auch auf andere okuläre Strukturen ausweiten. Häufig ist die Erkrankung von einer Vaskulitis begleitet, die oftmals in Form einer Aortitis, Takayasu-ähnlichen Vaskulitis oder einer Vaskulitis der mittelgroßen Gefäße auftritt. Diagnosestellung und die Einschätzung von Krankheitsaktivität erfolgt anhand der klinischen Symptomatik und allgemeiner laborchemischer Entzündungsparameter. Die Erkrankung wird mit Glukokortikoiden und anderen immunsuppressiven Medikamenten behandelt. [St Clair et al. 1999]

#### 2.1.3.9 RS<sub>3</sub>PE-Syndrom

Das RS<sub>3</sub>PE-Syndrom (Remitting Seronegative Symmetrical Synovitis with Pitting Edema) stellt wahrscheinlich eine Manifestation der Rheumatoiden Arthritis im Alter dar. [Segerer et al. 1999] Bei den Patienten kommt es neben einer plötzlich auftretenden symmetrischen Polysynovitis zu eindrückbaren Ödemen der Hand- und Fußrücken. Das Syndrom weist eine hohe Assoziation zu HLA-B7 auf und betrifft überwiegend Männer im höheren Alter. [Segerer et al. 1999; Mc Carty et al. 1985]

Die Diagnose und Einschätzung der Krankheitsaktivität erfolgt anhand der klinischen Symptomatik und allgemeiner laborchemischer Entzündungsparameter. In der Regel sind die Patienten Rheumafaktor-negativ. Das klassische Syndrom weist eine kurze Krankheitsdauer auf, ruft keine systemischen Manifestationen hervor und hat eine günstige Prognose. Die Erkrankung wird mit niedrig dosierten Glukokortikoiden behandelt. Nach Besserung der Beschwerden wird die Dosis weiter reduziert und nach Wochen ausgeschlichen, ohne daß ein hohes Rezidivrisiko besteht.



#### 2.1.4 Patienten mit einer aktiven Infektionskrankheit vor Therapiebeginn

Als Vergleich zu den in der vorliegenden Arbeit schwerpunktmäßig untersuchten Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung wurden orientierend im Sinne einer Pilotstudie 5 Patienten mit einer aktiven Infektionskrankheit vor Therapiebeginn untersucht. Dabei handelte es sich um männliche Patienten, welche stationär in der Infektiologischen Abteilung der Charité (Standort Wedding) behandelt wurden. Dieses Patientenkollektiv war durch eine erkrankungsbedingte klinische Symptomatik und laborchemisch erhöhte Entzündungsparameter gekennzeichnet. Das Durchschnittsalter dieser Gruppe betrug 26 Jahre. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme erfolgte bei keinem Patienten eine medikamentöse Behandlung. Alle Patienten wurden aufgeklärt und hatten ihre Einwilligung zur Blutentnahme gegeben. In der folgenden Tabelle sind zusammenfassend die Diagnosen und Anzahl der untersuchten Patienten mit einer akuten Infektionskrankheit dargestellt.

Tabelle 2: Diagnosen und Anzahl der untersuchten Patienten mit einer akuten Infektionskrankheit

<b>Diagnose / Infektion</b>	<b>Anzahl der untersuchten Patienten</b>
Hepatitis A	1
Hepatitis B	2
Infektiöse Mononukleose	1
Erysipel	1

##### 2.1.4.1 Hepatitis A / B Infektion

Virushepatitiden sind durch hepatotrope Viren verursachte Entzündungen der Leber mit sekundärer Leberzellschädigung. Sie werden mit grippalen Symptomen (Fieber, Abgeschlagenheit) und gastrointestinalen Beschwerden (Appetitlosigkeit, Übelkeit, Druckschmerz im rechten Oberbauch) symptomatisch. Das Stadium der Lebermanifestation kann ikterisch oder anikterisch verlaufen. Beim ikterischen Verlauf kommt es zu einer Dunkelfärbung des Urins, Entfärbung des Stuhls, Ikterus, Juckreiz und häufig auch zur Lebervergrößerung.

Die Hepatitis A wird durch ein RNA-Virus (HAV) hervorgerufen und verursacht etwa 55% aller akuten Virushepatitiden. Sie heilt regelmäßig aus und führt zur lebenslangen Immunität. Serologischer Marker der akuten Infektion ist der Nachweis von Anti-HAV-IgM.

Die Hepatitis B wird durch ein DNA-Virus (HBV) hervorgerufen und verursacht in Deutschland etwa 35% der Virushepatitiden. Sie kann in einen chronischen Verlauf übergehen. Serologische Marker der akuten Infektion sind HBsAg, HBeAg (korreliert mit dem Grad der Virusreplikation) und Anti-HBc-IgM.

Die Diagnose der Hepatitis wird anhand des klinischen Bildes und laborchemischer Parameter resultierend aus den Leberfunktionsstörungen (Transaminasen,  $\gamma$ -GT, AP, Bilirubin, Quick, Fe) gestellt. Die Formen der Virushepatitiden lassen sich klinisch nur schwer unterscheiden, so daß dem direktem Nachweis des Virus sowie spezifischer Antikörper und Titer eine entscheidende Bedeutung zukommt. [Lohr & Keppler et al. 1999]

#### 2.1.4.2 Infektiöse Mononukleose

Die Infektiöse Mononukleose wird auch „Pfeiffersches Drüsenfieber“ genannt und ist eine durch das Epstein-Barr-Virus (EBV) hervorgerufene Erkrankung. Zielzellen des Virus sind B-Lymphozyten und Epithelien des Oropharynx. Die Infektion verläuft bei Kindern oft subklinisch. Im Schulkind- und Erwachsenenalter kann sie jedoch zu einer Angina mit flächenhaften weißlichen Belägen auf den Tonsillen, begleitet von hohem Fieber führen. Zusätzlich kommt es bei glandulärem Verlauf zu einer lokalen oder generalisierten Lymphadenopathie mit Milzschwellung. Die Diagnose wird anhand des klinischen Bildes im Zusammenhang mit dem Nachweis von spezifischen Antikörpern gestellt. [Lohr & Keppler et al. 1999]

#### 2.1.4.3 Erysipel

Das Erysipel ist eine auf dem Lymphweg zur Ausbreitung neigende bakterielle Entzündung der Haut und des Unterhautzellgewebes. Erreger sind zumeist  $\beta$ -hämolysierende Streptokokken. Auf der Haut befindet sich eine scharf begrenzte, schmerzhaft, ödematöse Rötung mit flammenförmigen Ausläufern, oft mit Bläschen und Blasen. Die akute Infektion ist von hohem Fieber und Schüttelfrost begleitet. [Pschyrembel 1990]

## **2.2 Gewinnung der PBMC und Herstellung der Zellsuspension**

Die PBMC für die Sauerstoffverbrauchsmessungen wurden durch Blutentnahme bei Probanden und Patienten gewonnen. Dazu wurden 46 ml Vollblut aus einer peripheren Armvene entnommen und zur Antikoagulation mit drei Tropfen Heparin versetzt.

PBMC, die zur Weiterverarbeitung in der PCR dienten, wurden aus frischen Buffy coats isoliert. Die Buffy coats stellte die Blutspende der Charité zur Verfügung. Unter Buffy coat versteht man die Schicht aus Leukozyten und Thrombozyten, die sich nach Zentrifugation von ungerinnbar gemachtem Blut zwischen Plasma und sedimentierten Erythrozyten bildet.

Die Gewinnung der PBMC aus Vollblut bzw. Buffy coats erfolgte durch eine Dichtegradientenzentrifugation. Bedingt durch die Schwerkraft oder hier Zentrifugalkraft sedimentieren Zellen, wenn ihre Dichte größer ist als die ihrer Umgebung und schwimmen auf, wenn sie geringer ist. Existiert kein Dichteunterschied, so schweben sie. Die Zentrifugationslösung besteht aus kolloidalen Kieselgel, deren Konzentration und damit auch Dichte von der Oberfläche bis zum Boden zunimmt (Dichtegradient).

Als Zentrifugationslösung wurde Ficoll (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) genutzt. Ficoll dient speziell der Präparation von PBMC. Zunächst wird auf den Filter eines Röhrchen mit 50 ml Fassungsvermögen etwa 20 ml Ficoll gegeben. Nach kurzer Zentrifugation befindet sich die Ficoll-Lösung unterhalb des Filters. Danach wird das Vollblut bzw. etwas vom Buffy coat hinzu gegeben und das Röhrchen mit isotonischer Kochsalzlösung auf ein Gesamtvolumen von 50 ml aufgefüllt. Anschließend wird die Probe bei 2000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Die Lymphozytenschicht, die sich nach der Zentrifugation zwischen Ficoll und Plasma als weiße Interphase darstellt, wird vorsichtig abpipettiert und in ein neues Röhrchen ohne Filter überführt. Dieses Röhrchen wird erneut mit isotonischer Kochsalzlösung auf 50 ml aufgefüllt und bei 1800 rpm für 8 min zentrifugiert.

Nach diesem Schritt befindet sich nun am Boden des Röhrchens das Zellpellet. Der Überstand wird vorsichtig abgesaugt und verworfen. Dem Zellpellet aus Vollblut werden 3 ml und dem aus Buffy coats ca. 10 ml eines Inkubationsmediums zugegeben. Die Zellen werden resuspendiert und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis bei 4°C kühl gestellt.

Das Inkubationsmedium ist eine 1:1,5 Mischung aus Borsook- und Eaglemedium. Es ist isoton und enthält keine Glukose. Das Borsook-Medium besteht aus 0,15 M Tris/HCl-Lösung, pH 7,4,

der 19 L-Aminosäuren zugesetzt sind. [Borsook et al. 1971] Das Eagle-Medium ist eine Lösung aus Hanks Salzen ohne Glutamin und  $\text{NaHCO}_3$ . [Eagle et al. 1955]

Die Zellkonzentration wurde auf  $1,5\text{-}2,5 \times 10^7$  Lymphozyten pro ml Medium eingestellt. Diese Zellkonzentration ist relativ hoch, aber notwendig für die Sauerstoffverbrauchsmessungen. Die Differentialzählung ergab einen Anteil von 80-90% Lymphozyten sowie 10-20% Monozyten und Granulozyten. Außerdem enthielt die Zellsuspension Thrombozyten und noch sehr wenige Resterythrozyten. Die Vitalitätstestung der Zellen erfolgte durch Färbung mit Trypanblau. Über 95% der mikroskopierten Zellen nahmen keine Blaufärbung an und waren damit lebensfähig.

Bis zu ihrer Verwendung lagerte die gewonnene Zellsuspension für maximal 3 Stunden auf Eis. Eine signifikante bakterielle Kontamination trat unter diesen Bedingungen nicht auf, obwohl auf einen Antibiotikazusatz wegen der möglichen Beeinträchtigung der lymphozytären Proteinsynthese verzichtet wurde. [Buttgereit et al. 1992] Bei Untersuchungen zur Expression der Phosphodiesterase (PDE) wurden die Zellen nach ihrer Präparation unmittelbar weiter verarbeitet.

## **2.3 Messung des Sauerstoffverbrauchs**

### **2.3.1 Prinzip der Methode und Versuchsdurchführung**

#### **2.3.1.1 Prinzip**

Der Sauerstoffverbrauch wurde amperometrisch mit der Clark-Elektrode bestimmt. Der amperometrischen Methode liegt eine spezielle Form der Elektrolyse zu Grunde. Über mehrere Zwischenstufen wird Sauerstoff zu Hydroxylionen reduziert. Es entsteht ein Stromfluß, der bei gegebener Spannung der Konzentration an Sauerstoff proportional ist. Mit der Clark-Elektrode ist es möglich, die Sauerstoffkonzentration der Meßlösung kontinuierlich zu bestimmen. Durch Anschluß eines Schreibers an das Meßgerät läßt sich der Sauerstoffverbrauch über die Zeit registrieren. [Rapoport et al. 1977]

### 2.3.1.2 Versuchsdurchführung

Zur Messung des Sauerstoffverbrauches wurden 0,7 ml der Zellsuspension in die Meßkammer der Elektrode gegeben. Bei vorgegebener Zellkonzentration entsprach dies einer Zellzahl von ungefähr  $1-1,75 \times 10^7$  Zellen. Über ein Thermostat wurden Meßsystem und Zellsuspension während des Experimentes bei 37°C konstant gehalten. Ein Magnetrührer im Meßzylinder sorgte für eine ausreichende Äquibrierung der Suspension mit Sauerstoff und gewährleistete im Verlauf des Experimentes eine optimale Diffusion des Sauerstoffs zur Elektrode. Die Registriergeschwindigkeit des Schreibers betrug 0,2 mm/sec.

Im Kontakt mit der Luft (Sauerstoffgehalt der Luft: 20,9 Vol%) lösen sich bei 37°C und Normaldruck maximal 4,7 ml O<sub>2</sub> in 1 l H<sub>2</sub>O. Demnach befanden sich nach ausreichender Äquibrierung 147,7 nmol gelöster Sauerstoff in 0,7 ml Zellsuspension. Die Ermittlung des Meßbereiches (D<sub>100%</sub>) erfolgte durch Zugabe des einfachen Mediums ohne Zellen. Der Anstieg der erfaßten Kurve (D<sub>x</sub>) ist ein Maß für den Sauerstoffverbrauch (O<sub>2</sub>) pro Zeiteinheit (t).

Unter Berücksichtigung der eingesetzten Zellsuspensionsmenge errechneten wir den Sauerstoffverbrauch der PBMC normiert auf nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup>Zellen nach folgender Formel:

$$\text{O}_2\text{-Verbrauch [ nmol O}_2\text{/min/10}^7\text{Zellen ]} = \frac{\text{D}_x \text{ [cm/min ]} \times 147,7 \text{ [ nmol ]}}{\text{D}_{100 \%} \text{ [cm]} \times \text{Zellzahl}}$$

Durch Zugabe von Con A und selektiver Hemmstoffe zu dem vollständig gefüllten und abgeschlossenen Meßzylinder gingen Zellen durch Verdrängung verloren. Die dadurch eingetretene Verdünnung wurde mathematisch berücksichtigt.

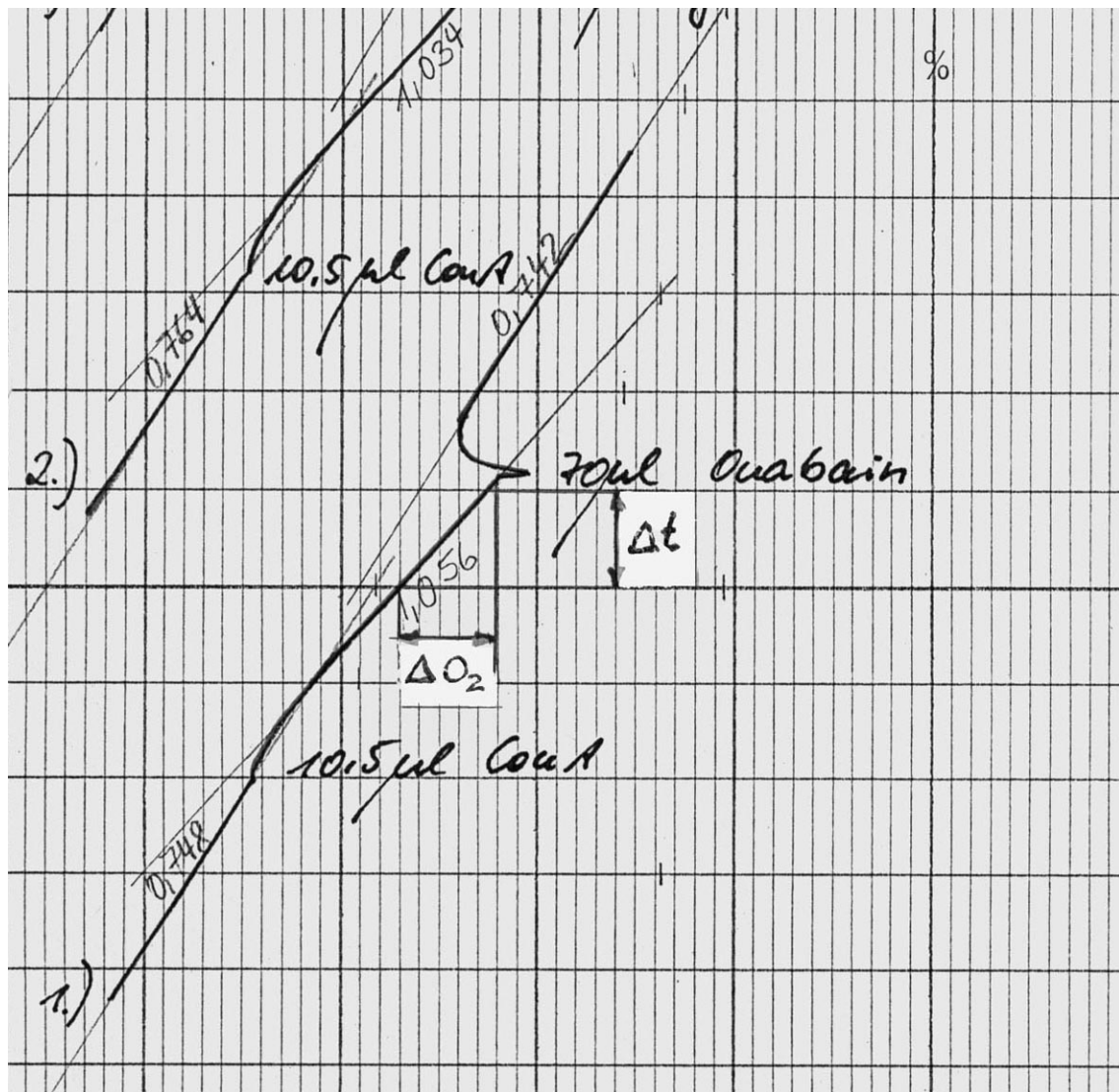


Abbildung 2: Originalmessung zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauches ( $O_2$ ) pro Zeiteinheit (t)

## 2.3.2 Concanavalin A und selektive Hemmstoffe

### 2.3.2.1 Concanavalin A (Con A)

Zur Stimulierung der PBMC wurde das mitogene Lektin Concanavalin A (Serva, Heidelberg, Germany) verwendet, welches aus Schwertbohnen gewonnen wird. Es wurde in einer Endkonzentration von 50 µg/ml eingesetzt. Diese Konzentration ergab sich aus Vorversuchen als optimale Menge zur Stimulierung von frisch aus humanem Vollblut präparierter PBMC. Bei einer standardisierten Zellkonzentration von  $1,5-2,5 \times 10^7$  Zellen/ml Medium entspricht dies einer durchschnittlichen Zugabe von 25 µg Con A /  $10^7$  Zellen bzw. 2,5 µg Con A /  $10^6$  Zellen. Damit liegt die verwendete Con A Konzentration in einem allgemein zur Stimulierung eingesetzten Bereich. [Edgar et al. 1999; Zemleni et al. 1999; Almawi et al. 1999] Con A wurde in einer Stammlösung mit 5 mg/ml destilliertem Wasser angesetzt.

### 2.3.2.2 Hemmstoffe

Die Bestimmung der sauerstoffverbrauchenden Prozesse erfolgte indirekt mittels selektiver Hemmstoffe.

Für die Blockierung der  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase wurde Ouabain, für die Proteinsynthese Cycloheximid, für die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Lanthan und für die DNA/RNA-Synthese Actinomycin D eingesetzt. Alle Substanzen wurden in Eagle's Basalmedium gelöst.

Ansätze der Hemmstoffe:

- |  |                    |
|--|--------------------|
| 1. Ouabain                                 | 21,87 mg / 3 ml    |
| Boehringer, Mannheim, Germany              | entspricht: 10 mM  |
| 2. Cycloheximid                            | 8,43 mg / 3 ml     |
| Serva, Heidelberg, Germany                 | entspricht: 10 mM  |
| 3. Lanthan-(III)-chlorid-7-hydrat          | 22,29 mg / 3 ml    |
| Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, Germany | entspricht: 20 mM  |
| 4. Actinomycin D                           | 7,6 mg / 10 ml     |
| Boehringer, Mannheim, Germany              | entspricht: 0,6 mM |

## **2.4 Semiquantitative PCR**

### **2.4.1 Prinzip der Methode**

Zur Untersuchung des Einflusses von Glukokortikoiden auf die Expression der cAMP-spezifischen PDE (Phosphodiesterase) wurde die Methode der semiquantitativen PCR eingesetzt.

Die PCR (polymerase chain reaction) ist eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren, die Mitte der achtziger Jahre von Kary Mullis entwickelt wurde. [Saiki et al. 1985; Mullis et al. 1987; Gassen et al. 1994] Das Reaktionsprinzip nutzt bestimmte Eigenschaften der Replikation (Verdopplung) von DNA in der Zelle. Für die Reaktion werden eine DNA- oder RNA-Matrize, eine DNA-Polymerase, Desoxynukleotide, zwei Oligonukleotide als Primer und ein geeignetes Puffersystem benötigt. Die DNA-Polymerase, ein DNA-vervielfältigendes Enzym, bedient sich der Einzelstrang-DNA als Matrize für die Synthese eines neuen, komplementären Stranges. Den Startpunkt der DNA-Synthese kann man festlegen, indem man Oligonukleotidprimer hinzufügt, die sich an der gewünschten Stelle an die Matrize anlagern. Diese Primer sind aus den flankierenden Bereichen der Matrize abgeleitet, weshalb das zu amplifizierende Fragment zwischen ihnen liegt.

Die gesamte Reaktion basiert auf drei Teilschritten mit jeweils unterschiedlichen Temperaturen, die ständig wiederholt werden. Im ersten Schritt, der Denaturierung der DNA-Doppelstränge (ca. 94°C) wird die DNA in Einzelstränge aufgeschmolzen. Beim Annealing, dem zweiten Schritt (ca. 50°C), hybridisieren die Oligonukleotidprimer mit den beiden DNA-Matrizen. Im dritten Schritt, der Polymerisation (ca. 72°C), dienen die Primer der DNA-Polymerase als Startmoleküle zur Kopierung der beiden Matrizenstränge.

In jedem Zyklus verdoppelt sich die Menge des von den Primern eingerahmten Matrizenfragments und wird im folgenden Zyklus zum Ausgangsmaterial. Als Endergebnis einer PCR enthält das Reaktionsgemisch am Ende von  $n$  Zyklen ein theoretisches Maximum von  $2^n$  doppelsträngigen DNA-Molekülen, die Kopien der DNA-Sequenz zwischen den Primern darstellen. [Gassen et al. 1994; Voet et al. 1992]

Die PCR wurde zwar ursprünglich für die Analytik der DNA entwickelt, konnte jedoch schon kurze Zeit später auch für Untersuchungen der RNA etabliert werden. So wurde es möglich RNA



als direktes Substrat, aber auch cDNA/RNA-Gemische für die PCR einzusetzen. Zur Analyse von Genexpressionen wird häufig die RT-PCR eingesetzt. Dabei dient RNA als Ausgangsmaterial. Mit dem Enzym Reverse Transkriptase wird dann eine DNA-Kopie (cDNA; copy DNA) hergestellt, die als Ausgangsmatrize für die Amplifikation dient. [Hermsdorf et al. 1999; Gassen et al. 1994]

Die Vervielfältigung der Nukleinsäuren folgt einer charakteristischen Kinetik. Bei Kenntnis und unter Berücksichtigung dieser Kinetik ist es möglich, die PCR als quantitative Methode einzusetzen und die Mengen an Nukleinsäuren von zwei oder mehreren Zellproben miteinander zu vergleichen. Die PCR und ihr Einsatz als quantitatives Verfahren stellt heute eine etablierte und anerkannte Methode zur Bestimmung von Nukleinsäuremengen dar. [Gassen et al. 1994, Guyon et al. 1994]

## 2.4.2 Versuchsaufbau

### 2.4.2.1 Zellpräparation und Inkubation mit Glukokortikoiden

Die Gewinnung der PBMC und Herstellung der Zellsuspension erfolgte wie im Kapitel 2.2 beschrieben. Es wurden humane PBMC aus Buffy coats verwendet, welche die Blutspendezentrale der Charité bereitstellte. Die angestrebte Konzentration der Zellsuspension betrug  $2,0 \times 10^7$  Zellen/ml. Die präparierte Zellsuspension wurde 5 min mit Luftsauerstoff äquilibriert und anschließend mit einem Glukokortikoid inkubiert. Die Inkubation mit dem Glukokortikoid Prednylidon-21-diethylaminoacetat-HCl erfolgte mit  $0,17 \text{ mg}/10^7$  Zellen (Decortilen<sup>®</sup>, MERCK, Darmstadt, Deutschland). Die Inkubation mit dem Glukokortikoid Dexamethason-21-Dihydrogenphosphat-Di-Na (Fortecortin<sup>®</sup>, MERCK, Darmstadt, Deutschland) erfolgte mit  $0,2 \text{ mg}/10^7$  Zellen. Diese Konzentrationen leiten sich aus Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an humanen PBMC aus Buffy coats ab. Da sich mit ihnen ein deutlicher Hemmeffekt auf den Sauerstoffverbrauch nachweisen ließ [Schmid et al. 2000], sollten nun für diese Konzentrationen Untersuchungen zur Expression der cAMP-spezifischen PDE folgen.

#### 2.4.2.2 Lysierung der PBMC und Isolierung der Gesamt-RNA

Die Gewinnung von Gesamt-RNA führten wir anhand des Protokoll des RNeasy<sup>TM</sup> Kit der Firma QIAGEN (Hilden, Deutschland) durch. Die Lysierung der PBMC erfolgte mit Hilfe des Lysepuffers Buffer RLT des RNeasy<sup>TM</sup> Kit. Im Anschluß daran wurde das Protokoll zur Gewinnung einer höheren Ausbeute und Reinheit der RNA durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion nach Chomczynski erweitert. [Bonham et al. 1996, Chomczynski et al. 1987] Die Phenol-Chloroform-Fällungsreaktion basiert auf dem unterschiedlichen Lösungsverhalten von DNA und RNA in organischen Lösungsmitteln. Mit ihr kann schon ein großer Anteil von Proteinen und DNA entfernt werden.

Zunächst wurde die Zellsuspension mit PBS gewaschen, der Überstand dekantiert und RLT-Lysepuffer auf das erhaltene Zellpellet gegeben. Die Homogenisierung der Probe erfolgte mittels QIAshredder.

Das gewonnene Lysat / Probe wurde entsprechend auf Tubes verteilt und mit 1/10 Volumen Na-Acetat (2 M, pH 4,0), 1 Volumen H<sub>2</sub>O-gesättigtes Phenol und pro ml Phenol mit 0,2 ml Chloroform / Isoamylalkohol-Gemisch (49:1) versetzt. Zur Phasentrennung erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei 10 000 rpm und 4°C. Danach wurde die obere wässrige Phase, in der sich die RNA befindet, abpipettiert, in Tubes verteilt und mit je 1 Volumen 70% igen DEPC-Alkohol gemischt.

Die weiteren Schritte zur Isolierung der RNA erfolgten wieder anhand des Protokolls des RNeasy<sup>TM</sup> Kit. Das Prinzip beruht auf einer Bindung der RNA an eine Silikonmembran. Nach mehreren Waschschritten mit hochkonzentrierten Salzlösungen und Alkohol, wurde die RNA durch RNase-freiem Wasser aus der Membran gelöst und darin aufgenommen. Anschließend erfolgte entweder eine sofortige Weiterverarbeitung oder die RNA-Proben wurden bei -80°C eingefroren. Zur qualitativen Überprüfung der RNA wurde die Gelelektrophorese eingesetzt. Die Konzentrationsbestimmung der gewonnenen RNA erfolgte mit dem Spektralphotometer Gene Quant II (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) bei  $\lambda_{260 \text{ nm}}$ . Der Reinheitsfaktor betrug mindestens 1,7-2.

#### 2.4.2.3 Umschreibung der RNA in cDNA

Die RNA-Gesamtpopulation setzt sich bei Eukaryoten zu 80-85% aus ribosomaler RNA, zu 10-15% aus transfer RNA und zu 2-4% aus messenger RNA zusammen. Die Analyse der mRNA-Population gibt Aufschluß darüber, welche Gene zum Zeitpunkt der Präparation in der jeweiligen Zelle exprimiert werden. Damit können Aussagen über den aktuellen Genexpressionsstatus des untersuchten Materials getroffen werden. [Gassen et al. 1994, Guyon et al. 1994] Durch Wahl des Oligo(dT)-Primer läßt sich aus der Gesamt-RNA eine mRNA-spezifische cDNA synthetisieren. Zur Umschreibung werden folgende Substanzen in einem Reaktionsvolumen von 20 µl je Probe benötigt:

##### 11 µl RNA-Primer-Mix:

- 10 µl einer definierten RNA-Menge (x µl RNA-Probe aufgefüllt mit Aqua dest.)
- 1 µl Oligo(dT)<sub>12-18</sub>-Primer<sup>1</sup>

##### 9 µl Master Mix:

- 1 µl SUPERScript™ II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase<sup>1</sup>
- 4 µl RT-Puffer (Strand Buffer)<sup>1</sup>
- 2 µl DTT-Puffer<sup>1</sup>
- 1 µl RNase-Inhibitor<sup>1</sup>
- 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)<sup>2</sup>

Der RNA-Primer-Mix wurde bei 80 °C für 5 min denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Der Mastermix wurde bei 43 °C für 5 min vorgewärmt, danach wurden je 9 µl Mastermix zum RNA-Primer-Mix zugegeben. Der gesamte Ansatz wurde bei 43 °C für 90 min zur Synthese und abschließend bei 90 °C für 1 min zur Enzyminaktivierung inkubiert. Das erhaltene cDNA/RNA-Gemisch wurde bei -20 °C gelagert.

#### 2.4.2.4 Einstellung der cDNA-Menge

Für den Vergleich der PCR-Produktmengen ist der Einsatz gleicher Ausgangsmengen an cDNA notwendig. Ein Einsatz unterschiedlicher cDNA-Mengen würde von vornherein eine unterschiedliche Menge an amplifizierten Nukleinsäuren nach sich ziehen und damit einen korrekten Vergleich des Untersuchungsmaterials ausschließen. Aus diesem Grund wurden die Mengen an cDNA der Proben abgeschätzt und gegebenenfalls korrigiert. [Schmid et al. 2000]

Die Einstellung der cDNA erfolgte über eine PCR, bei der als Standard Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) spezifische Sequenzen amplifiziert wurden. Das GAPDH-Gen gehört zu den sogenannten „housekeeping genes“. Das sind Gene, die im Zellzyklus mit gleichbleibender Intensität exprimiert werden und ubiquitär vorhanden sind. Daher wird die Expression der GAPDH häufig als interner Standard bei Genexpressionsuntersuchungen verwendet. [Hermsdorf et al. 1999; Köhler et al. 1995; Guyon et al. 1994; Dukas et al. 1993]

#### 2.4.2.5 Amplifikation der cDNA

Die für die Amplifikation der cAMP-spezifischen PDE und der GAPDH notwendigen Primer wurden computergestützt ermittelt. Mit Hilfe der Softwareprogramme Gene Man (Version 3.21, DNASTAR, Inc.) und Primer Select (Version 3.04a, DNASTAR, Inc.) wurden die DNA-Sequenzen gesucht und die entsprechenden Primer ausgewählt. [Schmid et al. 2000] Zur Amplifikation kamen folgende Substanzen zum Einsatz:

10 mM dNTP-Mix (mit je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) <sup>2</sup>

Ampli Taq Gold (5 U/μl) <sup>3</sup>

10X PCR-Puffer <sup>3</sup>

100 μM Primer (cAMP-spezifische PDE / GAPDH) <sup>1</sup>

steriles Aqua dest.

Tabelle 3: Primer zur Amplifikation der cAMP-spezifischen PDE und der GAPDH

<i>mRNA</i>	<i>Accession- Nummer</i>	<i>Primer</i>	<i>Primersequenzen (5'-3')</i>	<i>Amplifikat- Länge (in bp)</i>
cAMP- spezifische PDE	M37744	„upper“	AGTGTTCACGGACCTGGAGATT	730
		„lower“	GCCTGGCCCCTTGACT	
GAPDH	M33197	„upper“	ATGGGGAAGGTGAAGGTCGGAGTC	797
		„lower“	GACGCCTGCTTCACCACCTTCTTG	

Die Substanzen wurden in einem Reaktionsvolumen von 100 µl auf Eis pipettiert. Je nach Anzahl der benötigten Ansätze wurde entsprechend ein Vielfaches der Reagenzien angesetzt.

- 92 µl PCR-Mix - 2 µl dNTP-Mix (0,2 mM je dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
  - 10 µl 10X PCR-Puffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>)
  - 80 µl Aqua dest.
- 2 µl cDNA (Probe)
- 4 µl PDE-Primer-Mix - 2 µl „upper“ + 2 µl „lower“ Primer (1 µM je Primer)
  - bzw. GAPDH-Primer-Mix: - 2 µl „upper“ + 2 µl „lower“ Primer (0,5 µM je Primer)
- 2 µl Ampli Taq Gold (Menge: 2U)

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler (PTC-100, MJ Research) mit dem folgenden Protokoll:

- |  |       |        |
|--|-------|--------|
| 1. Initiale Aktivierung der Ampli Taq Gold | 93 °C | 20 min |
| 2. Denaturierung                           | 94 °C | 1 min  |
| 3. Annealing                               | 61 °C | 1 min  |
| 4. Extention (Polymerisation)              | 72 °C | 2 min  |
| (35 Wiederholungen des Schritt 2-4)        |       |        |
| 5. abschließende Extention                 | 72 °C | 10 min |

Am Ende der Extentionsphasen erfolgte die Entnahmen von jeweils 10 µl Probe. Die geschah für GAPDH-spezifische Sequenzen nach dem 22., 24., 26., 28., 30. und 32. Zyklus und für cAMP-spezifische PDE-Sequenzen nach dem 28., 30., 32., 34., 36. und 38. Zyklus. Die PCR-Produkte wurden bei 4° C gelagert.

#### 2.4.2.6 Analyse der Amplifikationsprodukte

Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem 1% igen Agarosegel aufgetrennt und computergestützt analysiert und quantifiziert. Es wurde 1% (w/v) Agarose <sup>4</sup> in 1 x TAE-Puffer <sup>4</sup> (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA mit Essigsäure auf pH 8,0 eingestellt) durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach Zugabe von Ethidiumbromid <sup>4</sup> mit einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml wurde das Gel gegossen. Anschließend erfolgte die Pipettierung von jeweils 4 µl PCR-Proben mit 2 µl 3 x Ladepuffer (0,03 % Bromphenolblau, 0,03 % Xylene Cyanol FF, 15 % Glycerol, 25 mM EDTA pH 8,0) in die Geltaschen und unter konstanter Stromstärke und -spannung die Auftrennung. Bei jeder Elektrophorese wurde ein Längenstandard (Low DNA MASS<sup>TM</sup> Ladder) <sup>1</sup> mitgeführt.

Die Aufnahme des Gels erfolgte mit Hilfe des Videokamera-Dokumentationssytemes. (Appligene, Inc.) Unter UV-Durchleuchtung (Transluminator Modell EB25, Ultra-LUM, Inc.) wurde eine Schwarzweißaufnahme erzeugt, digital gespeichert und mittels Software Imager 1D&2D (Version 2.0, Appligene, Inc.) densitometrisch ausgewertet. Durch Summation der Helligkeitswerte im Bereich der Spuren wurde eine Kurve erzeugt, deren Integral proportional zu der erfassenden Bandenintensität war und somit als Maß für diese verwendet werden konnte. Die Angaben erfolgten in AU (arbitrary units). [Schmid et al. 2000]

#### 2.4.2.7 Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die amplifizierten DNA-Produkte wurden mit Restriktionsendonukleasen geschnitten und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die spezifische Basensequenzen erkennen und die Nukleotidstränge an dieser Stelle spalten. Nach elektrophoretischer Auftrennung ergeben die Fragmente der Nukleotidstränge ein spezifisches Muster, das charakteristisch für die untersuchten Nukleotidstränge ist. Das Muster ergibt damit einen Hinweis auf die Spezifität der amplifizierten PCR-Produkte. [Schmid et al. 2000]

Zum Schneiden der PCR-Produkte der cAMP-spezifischen PDE wurden die Restriktionsenzyme Nco I<sup>5</sup> und Pst I<sup>5</sup> ermittelt, zum Fragmentieren der PCR-Produkte der GAPDH die Restriktionsenzyme Hinf I<sup>2</sup> und Hinf III<sup>6</sup>. Als Puffer wurde 10 x OPA Puffer Plus<sup>6</sup> eingesetzt. Die Ermittlung der Restriktionsschnittstellen erfolgte computergestützt mit Hilfe des Programmes Map Draw (Version 3.08, DNASTAR, Inc.). Bei der Auftrennung wurde als Längenstandard der DNA Molecular Weight Marker VI<sup>2</sup> verwendet. Zu einem Gesamtvolumen von 10 µl erfolgte die Zugabe von je 4 µl PCR-Produkt, 5U des spezifischen Restriktionsenzym und des entsprechenden Volumens des OPA Puffer Plus. Nach einer Inkubation bei 37 °C für 60 min wurde das Gemisch in einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt.

<sup>1</sup> Life Technologie GmbH, Eggenstein, Deutschland;

<sup>2</sup> La Roche, Mannheim, Deutschland;

<sup>3</sup> Perkin Elmer-Applied Biosystems Division, Foster City, USA;

<sup>4</sup> Sigma, Deisenhofen, Deutschland;

<sup>5</sup> Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland;

<sup>6</sup> Pharmacia, Freiburg, Deutschland

## **2.5 Statistische Auswertungen**

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte auf der Grundlage der Berechnung des arithmetischen Mittelwertes (MW) und der Standardabweichung (SD bzw. SEM). Zum Vergleich zweier verbundener Stichproben wurde der T-Test bei gepaarten Stichproben eingesetzt. Beim Vergleich zweier nicht verbundener Stichproben wurde der T-Test bei unabhängigen Stichproben angewendet. Eine statistische Wahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  wurde als signifikant angesehen.



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 **PBMC-Energiestoffwechsel von Probanden im Vergleich zu Patienten mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen**

##### 3.1.1 Gesamtsauerstoffverbrauch der PBMC im Vergleich zwischen den Gruppen

###### 3.1.1.1 Probanden

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war es, erstmalig den Normalbereich für den Gesamtsauerstoffverbrauch von humanen, frisch aus Vollblut präparierten PBMC im Ruhezustand zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurden gesunde Probanden beiderlei Geschlechts untersucht, um eventuell vorhandene, geschlechtsspezifische Unterschiede nicht zu übersehen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Abbildung 3 dargestellt.

Sauerstoffverbrauch (nmol O<sub>2</sub> /min /10<sup>7</sup> Zellen)

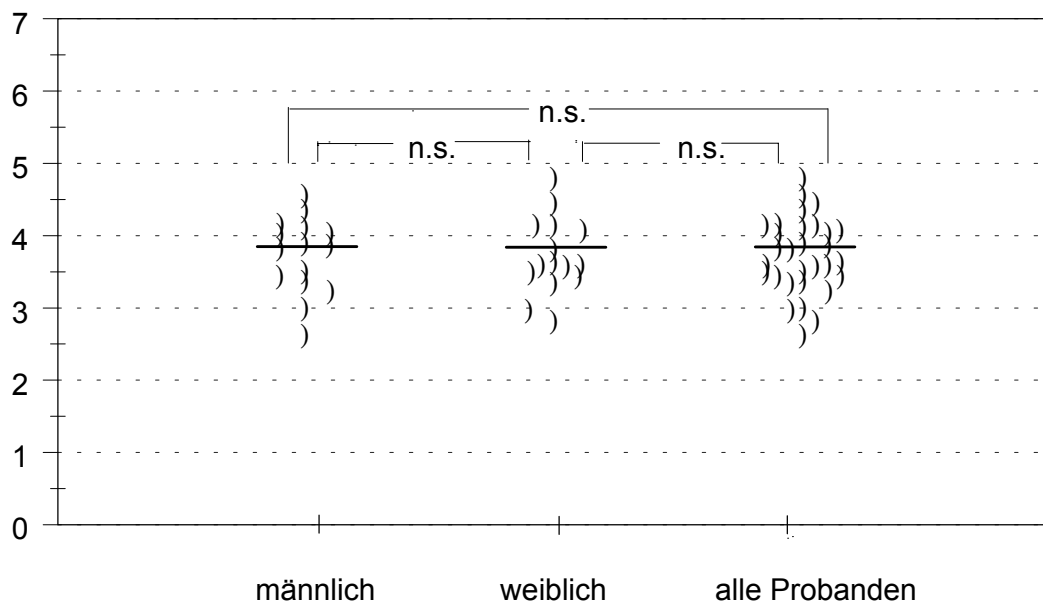


Abbildung 3: Gesamtsauerstoffverbrauch ruhender PBMC von weiblichen und männlichen Probanden. Die MW wurden als Balken eingezeichnet.

Demnach betrug der Gesamtsauerstoffverbrauch der PBMC weiblicher Probanden  $3,84 \pm 0,14$  nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen (n=15) und bei den männlichen Probanden  $3,85 \pm 0,14$  nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen (n=15). Alle Angaben erfolgen in MW  $\pm$  SEM. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen ist statistisch nicht signifikant (p=0,971). Aus diesem Grund wurden im weiteren weibliche und männliche Probanden zu einer Gruppe zusammengefaßt, und es wurde für die folgenden

Experimente keine getrennte Betrachtung der Geschlechter mehr vorgenommen. Die PBMC gesunder Probanden im Alter zwischen 20-30 Jahren haben demnach einen Gesamtsauerstoffverbrauch von  $3,84 \pm 0,1$  nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen (n=30).

### 3.1.1.2 Patienten

Wir stellten uns nun die Frage, ob es Unterschiede im Gesamtsauerstoffverbrauch von PBMC zwischen Probanden und Patienten gibt. Zu diesem Zweck wurden zunächst Patienten mit einer entzündlich-rheumatischen Erkrankung untersucht. Die Patienten hatten entsprechend den schon beschriebenen Kriterien entweder eine inaktive oder aktive Erkrankung. Die Patientengruppen setzten sich aus weiblichen wie auch männlichen Erkrankten zusammen. Zusätzlich wurde eine Kontrollgruppe von Patienten mit einer akuten Infektion vor Therapiebeginn untersucht. In der Abbildung 4 sind die erhaltenen Ergebnisse dargestellt. Als Vergleichskolumne wurde die Gruppe der gesunden Probanden in die Abbildung mit aufgenommen.

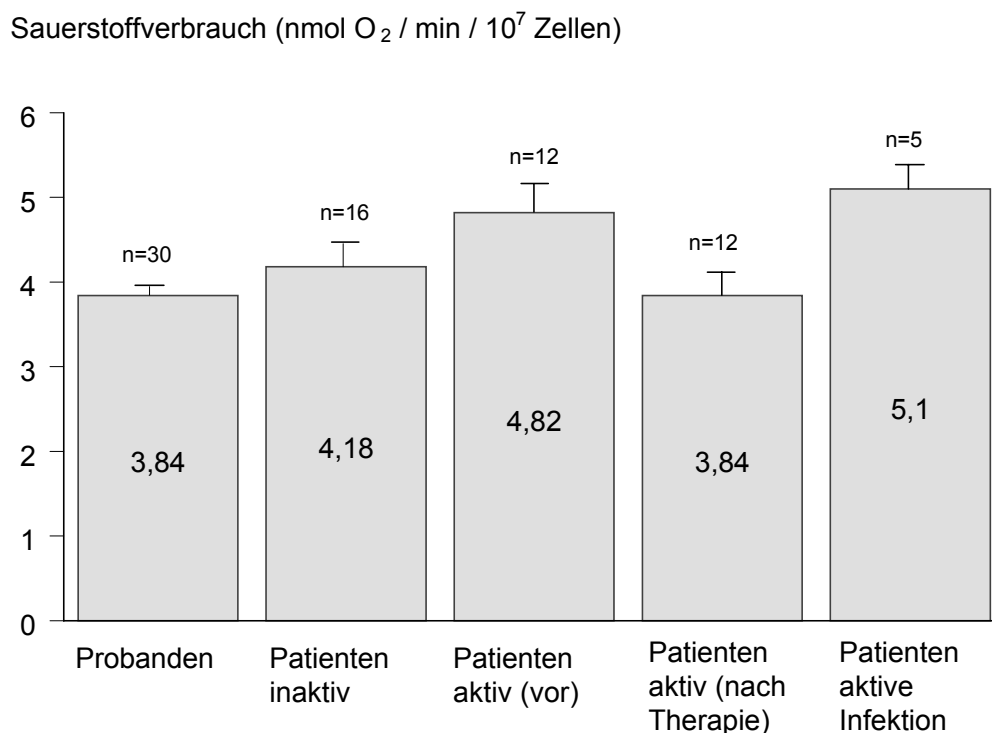


Abbildung 4: Gesamtsauerstoffverbrauch von Probanden und Patienten mit einer entzündlich-rheumatischen Erkrankung (inaktiv, aktiv) bzw. mit einer akuten Infektion vor Therapiebeginn. Angegeben sind die MW und Anzahl der untersuchten Probanden und Patienten. Der SEM wurde eingezeichnet.

Bei PBMC von Probanden lag ein Gesamtsauerstoffverbrauch von  $3,84 \pm 0,1$  nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen vor. Somit zeigte sich, daß die Atmung von PBMC bei Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung mit  $4,18 \pm 0,28$  nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen (n=16) etwas zunimmt, aber nicht signifikant höher als bei Probanden ist (p=0,157).

Bei Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung war der Gesamtsauerstoffverbrauch der PBMC mit  $4,82 \pm 0,33$  nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen (n=12) noch höher. Dieser Unterschied ist gegenüber der Gruppe der Probanden statistisch signifikant (p<0,001), nicht jedoch gegenüber der Gruppe der Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung (p=0,140).

Wir stellten uns die Frage, ob dieser erhöhte Gesamtsauerstoffverbrauch bei Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung durch die Therapie beeinflusst wird. Aus diesem Grund wurden alle Patienten mit einer aktiven Erkrankung auch im Verlauf unter Glukokortikoidtherapie untersucht. Wie in der Abbildung 4 zu sehen ist, kommt es nach einer 4-5 tägigen Behandlung mit Glukokortikoiden mit  $3,84 \pm 0,27$  nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen zu einem signifikanten Rückgang des Gesamtsauerstoffverbrauchs der PBMC (p=0,049). Als Vergleich, zu den in der vorliegenden Arbeit schwerpunktmäßig untersuchten Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung, wurden orientierend im Sinne einer Pilotstudie, auch 5 Patienten mit einer aktiven Infektionskrankheit vor Therapiebeginn untersucht. Die PBMC von Patienten mit einer akuten Infektion hatten einen Gesamtsauerstoffverbrauch von  $5,1 \pm 0,29$  nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen (n=5). Im Vergleich zu den anderen untersuchten Gruppen ist er am höchsten. Der Gesamtsauerstoffverbrauch der PBMC von Patienten mit einer Infektion ist gegenüber Probanden statistisch signifikant höher (p<0,001) und ohne signifikanten Unterschied zu Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung vor Therapiebeginn (p=0,591).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß der Gesamtsauerstoffverbrauch von PBMC gesunder Probanden den Verbrauch unter physiologischen Bedingungen darstellt. PBMC von Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung haben offenbar einen etwas höheren Energiebedarf gegenüber Probanden. Dieser spiegelt sich in einem leicht erhöhtem Gesamtsauerstoffverbrauch wider. PBMC von Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung haben den höchsten Gesamtsauerstoffverbrauch innerhalb der Gruppe der entzündlich-rheumatisch Erkrankten. Nach Therapie und Supprimierung der Krankheitsaktivität nimmt dieser wieder ab. Den größten Gesamtsauerstoffverbrauch überhaupt haben in unseren Untersuchungen PBMC von Patienten mit einer akuten Infektion.

Wir schlußfolgern aus diesen Ergebnissen, daß der Sauerstoffverbrauch humaner, aus Vollblut präparierter PBMC von Patienten mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen offenbar den Aktivitätszustand der Erkrankung reflektiert. Diese Aussage scheint ebenfalls bei Aktivierung von Immunzellen durch eine Infektion zuzutreffen.

### 3.1.2 Stimulierbarkeit der PBMC im Vergleich zwischen den Gruppen

Im weiteren wurde die Frage nach der Reaktionsfähigkeit der PBMC auf eine definierte Stimulation aufgeworfen. Um die Reaktion auf eine antigene Stimulation zu simulieren, haben wir mit dem Mitogen Con A gearbeitet. Dabei wurde stets die gleiche Menge Con A verwendet und es wurde immer nach einer 2,9 minütigen Stimulation die Atmung gemessen. Im Unterschied zum Antigen kommt es beim Mitogen zu einer sehr stark ausgeprägten polyklonalen Stimulation, die mit der Sauerstoffelektrode exakt quantifizierbar ist. Die Stimulierung mit Con A hatte in allen Gruppen einen signifikant erhöhten Sauerstoffverbrauch der PBMC zur Folge ( $p \leq 0,001$ ). Dieser ist in der Abbildung 5 dargestellt.

Die PBMC der Gruppe der Probanden hatten einen Sauerstoffverbrauch von  $5,87 \pm 0,17$  nmol  $O_2$ /min/ $10^7$  Zellen, die der Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung von  $6,33 \pm 0,48$  nmol  $O_2$ /min/ $10^7$  Zellen. Bei der Gruppe mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung betrug er vor der Therapie  $6,33 \pm 0,43$  nmol  $O_2$ /min/ $10^7$  Zellen und nach der Therapie  $5,66 \pm 0,58$  nmol  $O_2$ /min/ $10^7$  Zellen. PBMC von Patienten mit einer akuten Infektion hatten nach Stimulation einen Sauerstoffverbrauch von  $8,00 \pm 0,67$  nmol  $O_2$ /min/ $10^7$  Zellen.

Sauerstoffverbrauch (nmol O<sub>2</sub> / min / 10<sup>7</sup> Zellen)

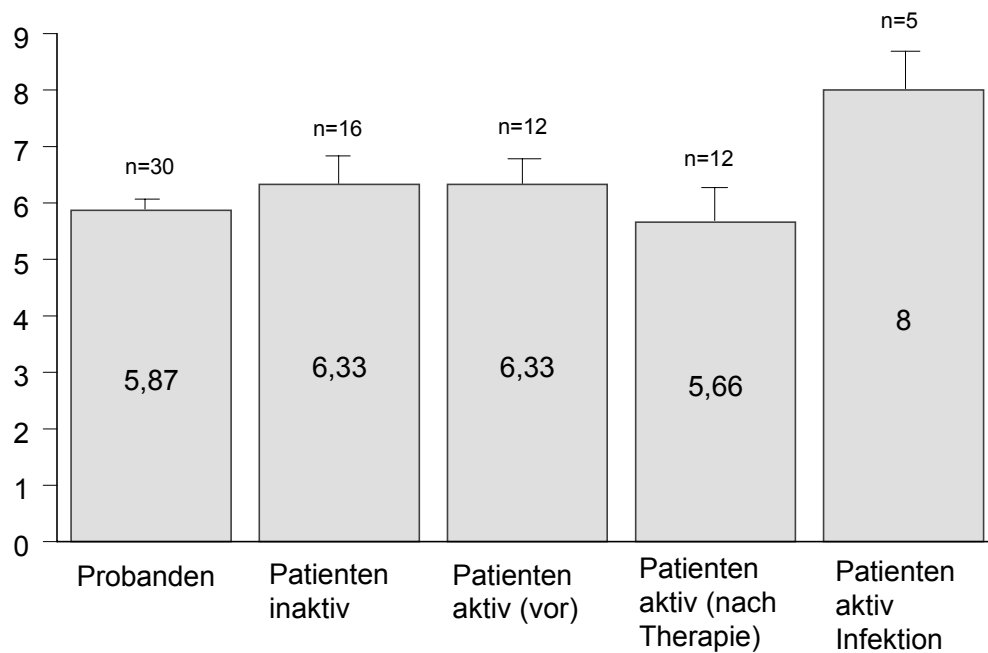


Abbildung 5: Sauerstoffverbrauch der PBMC von Probanden und Patienten mit einer entzündlich-rheumatischen Erkrankung (inaktiv, aktiv) bzw. mit einer akuten Infektion vor Therapiebeginn nach Stimulation mit Con A. Angegeben sind die MW und die Anzahl der untersuchten Probanden und Patienten. Der SEM wurde eingezeichnet.

Von besonderer Bedeutung ist die Differenz zwischen dem Gesamtsauerstoffverbrauch ruhender und dem stimulierter PBMC. Sie beschreibt die Stimulierbarkeit bzw. den absoluten Stimulatio-  
 onseffekt und entspricht dem Betrag, um den die Zellen unter unseren standardisierten Bedin-  
 gungen ihren Sauerstoffverbrauch steigern können. Der Sauerstoffverbrauch nach Con A Stimu-  
 lation ist in der Abbildung 6 als Absolutbetrag in nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen und in der Abbildung 7  
 prozentual bezogen auf den basalen Gesamtsauerstoffverbrauch wiedergegeben. Aufgrund des  
 verschieden hohen basalen Gesamtsauerstoffverbrauchs in den Gruppen, haben wir die prozen-  
 tuale Stimulierbarkeit als beschreibenden Parameter zusätzlich angegeben. Wir können damit  
 innerhalb der Gruppen die unterschiedliche Fähigkeit, den Sauerstoffverbrauch auf einen defi-  
 nierten Stimulus zu erhöhen, deutlicher aufzeigen.

Stimulierbarkeit (nmol O<sub>2</sub> / min / 10<sup>7</sup> Zellen)

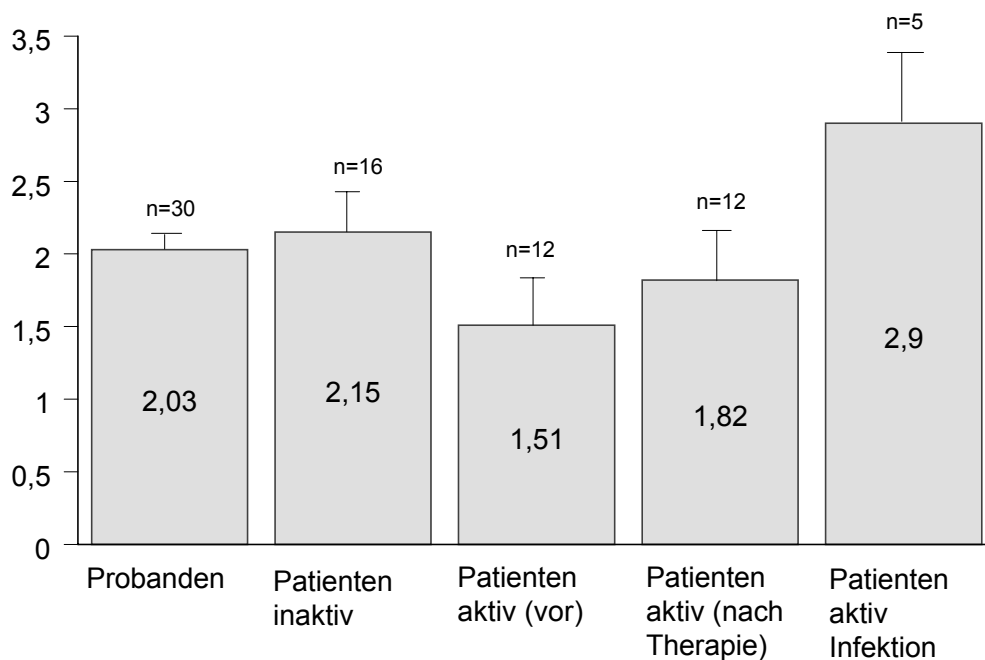
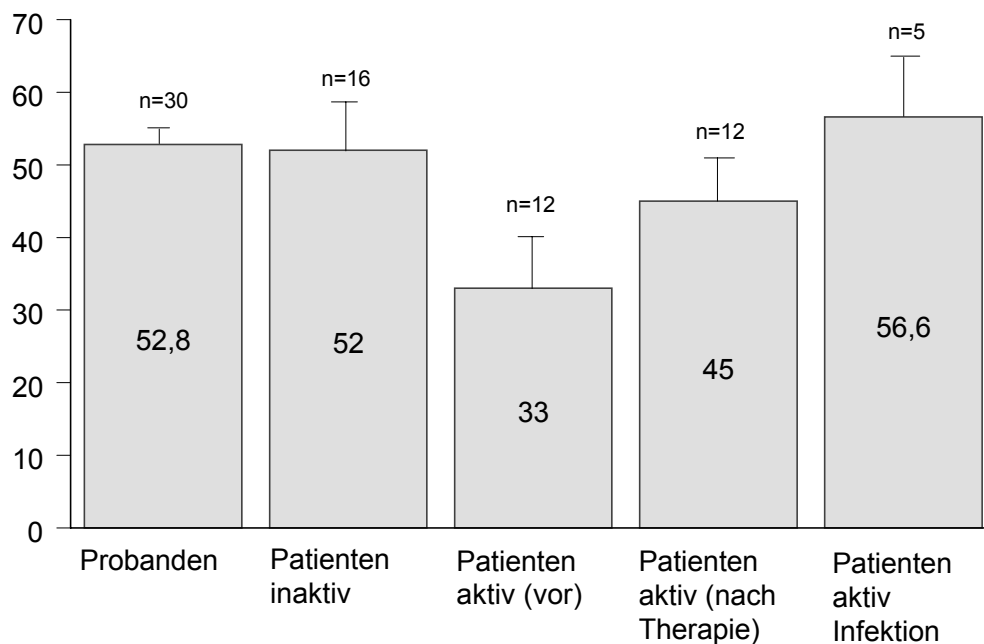


Abbildung 6: Con A-Stimulierbarkeit in nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen von Probanden und Patienten mit einer entzündlich-rheumatischen Erkrankung (inaktiv, aktiv) bzw. mit einer akuten Infektion vor Therapiebeginn. Angegeben sind die MW und die Anzahl der untersuchten Probanden und Patienten. Der SEM wurde eingezeichnet.

In der Gruppe der Probanden nahm der O<sub>2</sub>-Verbrauch um 2,03 ± 0,1 nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen zu. Diese Zunahme entspricht einem Plus um 52,8 % bezogen auf den basalen Gesamtsauerstoffverbrauch.

Bei Patienten mit einer inaktiven entzündlich - rheumatischen Erkrankung wurde durch Con A eine signifikante Steigerung um 2,15 ± 0,28 nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen hervorgerufen. Das entspricht einem Zuwachs um 52,0 % verglichen mit dem basalen Gesamtsauerstoffverbrauch. Die PBMC der Patienten mit einer inaktiven entzündlich - rheumatischen Erkrankung hatten zwar einen etwas höheren basalen Gesamtsauerstoffverbrauch, unterschieden sich aber weder absolut (p=0,602) noch prozentual (p=0,893) signifikant in ihrer Stimulierbarkeit von der Gruppe der Probanden. Die PBMC beider Gruppen sind somit unter unseren experimentellen Bedingungen in gleicher Weise in der Lage, ihren Gesamtsauerstoffverbrauch zu erhöhen.

Stimulierbarkeit in %



**Abbildung 7:** Con A-Stimulierbarkeit in % von Probanden und Patienten mit einer entzündlich-rheumatischen Erkrankung (inaktiv, aktiv) bzw. mit einer akuten Infektion vor Therapiebeginn. Angegeben sind die MW und die Anzahl der untersuchten Probanden und Patienten. Der SEM wurde eingezeichnet.

Im Gegensatz dazu wurde der Sauerstoffverbrauch bei PBMC von Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung vor Therapiebeginn durch Con A nur noch um  $1,51 \pm 0,33$  nmol  $O_2$ /min/ $10^7$  Zellen gesteigert. Dies entsprach einem Zuwachs um nur 33,0 % verglichen mit dem Basalwert. Diese Werte sind absolut ( $p=0,044$ ) und prozentual ( $p=0,001$ ) signifikant niedriger als bei Probanden. Verglichen mit den Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung ist diese Änderung statistisch jedoch absolut ( $p=0,136$ ) und prozentual ohne Signifikanz ( $p=0,056$ ), wenngleich der prozentuale Wert auf einen deutlichen Unterschied hinweist.

Nach der Glukokortikoidtherapie wurde der Sauerstoffverbrauch durch Con A um  $1,82 \pm 0,34$  nmol  $O_2$ /min/ $10^7$  Zellen gesteigert, was ausgehend vom Basalwert einer Stimulierung von 45,0% entspricht. Damit nahm die Stimulierbarkeit bedingt durch die Glukokortikoidtherapie wieder zu, wenn auch nicht signifikant ( $p=0,418$  /  $p=0,090$ ).

Bei den zum Vergleich untersuchten PBMC von Patienten mit einer akuten Infektion wurde durch Con A eine signifikante Steigerung des Sauerstoffverbrauchs um  $2,90 \pm 0,49$  nmol  $O_2$ /min/ $10^7$  Zellen hervorgerufen ( $n=5$ ). Prozentual entsprach dies einer Stimulierung von 56,6%.

Damit reagieren die PBMC von Patienten mit einer akuten Infektion sowohl absolut als auch prozentual am stärksten auf einen definierten Stimulus verglichen mit allen anderen Gruppen in unserer Untersuchung. Der absolute Unterschied ist bezüglich den Probanden ( $p=0,005$ ) und Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung ( $p=0,026$ ) signifikant verschieden. Prozentual unterscheidet sich die Stimulierbarkeit jedoch nicht signifikant gegenüber den Probanden ( $p=0,500$ ) und Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung ( $p=0,059$ ).

Für diese Untersuchungen läßt sich zusammenfassend feststellen, daß sich die Stimulierbarkeit der PBMC bei Probanden und bei Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung in etwa gleich verhält. Bei den PBMC von Patienten mit einer aktiven-entzündlich rheumatischen Erkrankung ist sie deutlich und statistisch signifikant vermindert, nimmt aber nach Behandlung mit Glukokortikoiden wieder zu. Bei den untersuchten PBMC von Patienten mit einer akuten Infektion ist die Stimulierbarkeit am größten. Im Gegensatz dazu ist diese bei den Patienten mit einer aktiven-entzündlich rheumatischen Erkrankung am geringsten ausgefallen. Damit verhält sich die Stimulierbarkeit in beiden Gruppen anscheinend gegensätzlich.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß sich offenbar auch aus der Stimulierbarkeit eine Aussage zur Aktivität entzündlich-rheumatischer Erkrankungen ableiten läßt. Die Daten belegen, daß mit zunehmender Aktivität der entzündlich-rheumatischen Erkrankung die Fähigkeit zur Stimulierung abnimmt.



### 3.1.3 Hauptenergieverbrauchende Prozesse in ruhenden PBMC

#### 3.1.3.1 Probanden

Aus den genannten Ergebnissen wurde deutlich, daß sich der Gesamtsauerstoffverbrauch der PBMC zwischen den einzelnen Gruppen unterscheidet. Bioenergetisch gesehen ist der Sauerstoffverbrauch ein umfassender Parameter, der nur eine grobe Auskunft über den Energiestoffwechsel gibt. Hinter ihm verbergen sich die ungekoppelte Atmung, der extramitochondriale Sauerstoffverbrauch und vor allem die verschiedenen energieverbrauchenden Prozesse. Zur Quantifizierung dieser Prozesse wurde das bioenergetische Profil von ruhenden PBMC erstellt. Dazu haben wir nach der im Material und Methoden-Teil beschriebenen Vorgehensweise den Verbrauch durch die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, Proteinsynthese und DNA/RNA-Synthese bestimmt, weil diese Prozesse aus früheren Untersuchungen als Hauptenergieverbraucher bekannt sind. [Schmid et al. 2000; Buttgerit et al. 1992, 1991] Wir haben die PBMC im Ruhezustand von Probanden und Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung bilanziert, während uns für die Untersuchungen der PBMC von Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung nicht ausreichend Zellen zur Verfügung standen. Eine Bilanzierung von mitogen-stimulierten PBMC führten wir dagegen in allen Gruppen durch.

Wir bestimmten zuerst die hauptenergieverbrauchenden Prozesse in ruhenden Zellen bei Probanden. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 8 dargestellt. Der Gesamtsauerstoffverbrauch ruhender PBMC von Probanden betrug in dieser Experimentreihe  $3,74 \pm 0,13 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7$  Zellen ( $n=30$ ) und ist somit ohne signifikanten Unterschied zu dem weiter vorn beschriebenen Wert für die Gesamtpopulation von  $3,84 \pm 0,1 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7$  Zellen ( $p=0,496$ ). Die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase verbrauchte unter diesen Bedingungen  $0,25 \pm 0,15 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7$  Zellen (6,7%) und die Proteinbiosynthese  $0,33 \pm 0,18 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7$  Zellen (8,8%). Beide Prozesse zusammengefaßt ergeben einen Anteil von  $0,58 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7$  Zellen (15,5%) am Gesamtsauerstoffverbrauch. Aufgrund dessen waren sie die wesentlichen energieverbrauchenden Prozesse in ruhenden PBMC der Probanden.

Die Hemmstoffe Lanthan und Actinomycin D rufen in ruhenden Zellen keine signifikante Hemmung des Sauerstoffverbrauchs vor. Daraus ist zu schlußfolgern, daß unter diesen Bedingungen weder die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase noch die DNA/RNA-Synthese von meßbarer bioenergetischer Bedeutung sind. Für Lanthan wurde sogar eine Steigerung des Sauerstoffverbrauchs beobachtet. Die Ursache für diesen Effekt ist bisher unklar.

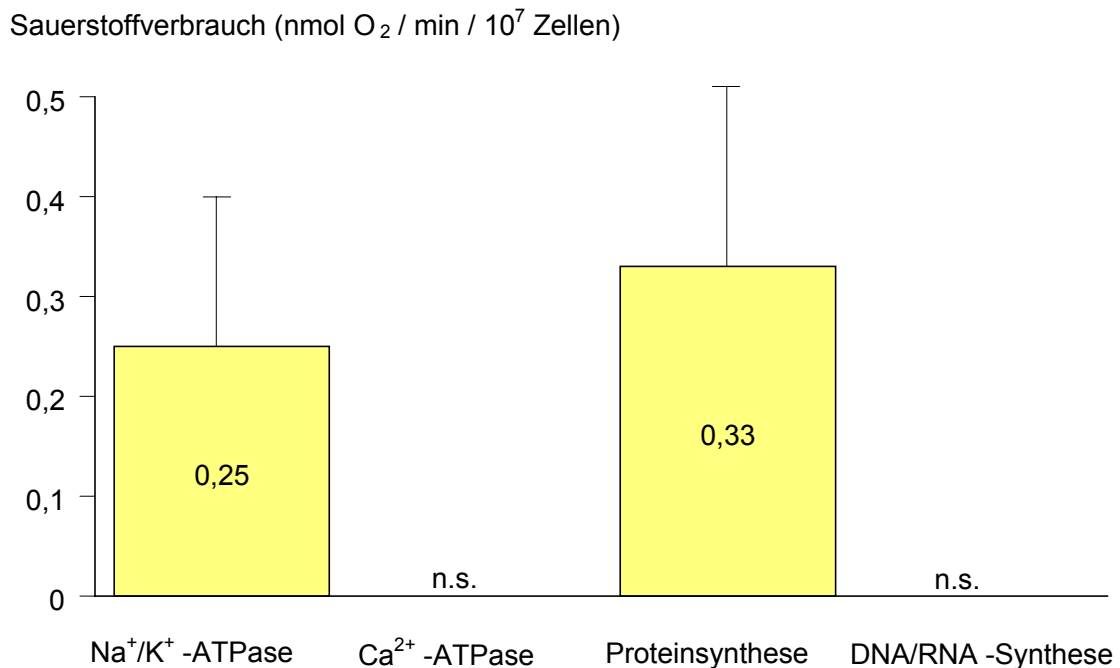


Abbildung 8: Sauerstoffverbrauch für ATP-verbrauchende Prozesse in ruhenden PBMC von Probanden (n=30). Dargestellt sind die MW. Die Standardabweichung wurde eingezeichnet.

Neben dem Sauerstoffbedarf der genannten ATP-Verbraucher wird in PBMC zusätzlich auch Sauerstoff für das Protonenleak und andere extramitochondrial gelegene Prozesse verbraucht. Dieser Verbrauch wird auch als ungekoppelte Atmung bezeichnet. Er wurde bereits früher in unserem Labor für ruhende PBMC mit einem prozentualen Bedarf von 16,85% bestimmt. [Schmid et al. 2000] Auf diese Untersuchungen angewandt errechnet sich ein Bedarf von etwa 0,63 nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen.

Zusammenfassend können wir mit unseren Untersuchungen in PBMC von gesunden Probanden insgesamt 15,5% des Gesamtsauerstoffverbrauchs ATP-verbrauchenden Prozessen zuordnen. Das sind 0,58 nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen und ergibt sich aus einem Verbrauch für die Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase und Proteinsynthese. Hinter den verbleibenden 3,16 nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen (84,5%) verbergen sich der ungekoppelte und der extramitochondriale Sauerstoffverbrauch sowie der Sauerstoffverbrauch, um die ATP-Bereitstellung für andere Prozesse zu sichern.

### 3.1.3.2 Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung

Im weiteren wurden PBMC von Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung unter ruhenden Bedingungen untersucht. Ihr leicht erhöhter Gesamtsauerstoffverbrauch ließ auf eine erhöhte Aktivität schließen. Somit stellte sich die Frage, ob diese Tatsache einen veränderten Umfang der einzelnen energieverbrauchenden Prozesse reflektiert. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 9 dargestellt.

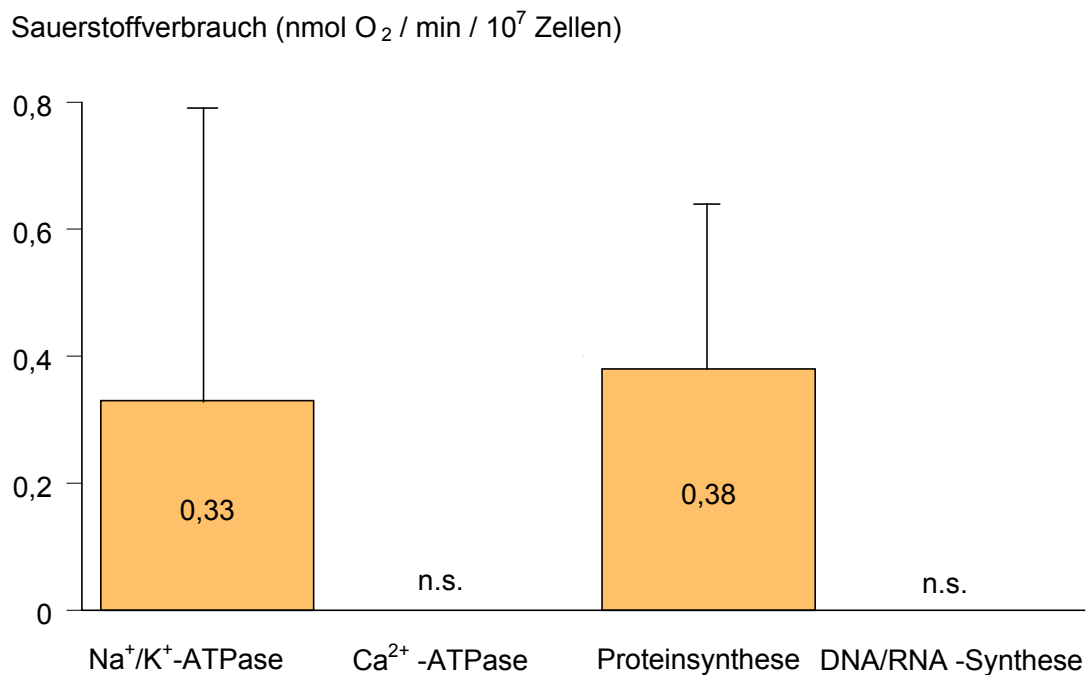


Abbildung 9: Sauerstoffverbrauch für ATP-verbrauchende Prozesse in ruhenden PBMC von Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung (n=15). Dargestellt sind die MW. Die Standardabweichung wurde eingezeichnet.

Der Gesamtsauerstoffverbrauch ruhender PBMC betrug in dieser Experimentreihe  $4,29 \pm 0,34$  nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen. Er ist damit ohne signifikanten Unterschied zu dem weiter vorn beschriebenen Wert von  $4,18 \pm 0,28$  nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen für die Gesamtpopulation der Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung (p=0,811).

Die Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase wies unter diesen Bedingungen einen Sauerstoffverbrauch von  $0,33 \pm 0,46$  nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen (7,7%) auf. Die Proteinsynthese verbrauchte  $0,38 \pm 0,26$  nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen (8,9%). Beide Prozesse zusammengefaßt ergeben einen Anteil von  $0,71$  nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen (16,6%) am Gesamtsauerstoffverbrauch und sind auch hier die wesentlichen energieverbrauchenden Prozesse in ruhenden PBMC. Die Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase (p=0,410) und Proteinsynthese (p=0,428) unterscheiden sich in ihrem Verbrauch nicht signifikant zu den der Proban-

den. Die Hemmstoffe Lanthan und Actinomycin D rufen in ruhenden PBMC von Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung ebenfalls keine signifikante Hemmung des Sauerstoffverbrauchs hervor. Daher scheinen die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und die DNA/RNA-Synthese auch hier nicht von meßbarer bioenergetischer Bedeutung zu sein. Für Lanthan wurde eine Steigerung des Sauerstoffverbrauchs beobachtet, deren Ursache noch ungeklärt ist.

Zusammenfassend können wir in PBMC von Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung insgesamt 16,6% des Gesamtsauerstoffverbrauchs ATP-verbrauchenden Prozessen zuordnen. Das sind  $0,71 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7$  Zellen und ergibt sich aus einem Verbrauch für die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase und Proteinsynthese. Hinter den verbleibenden  $3,58 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7$  Zellen (83,4%) verbergen sich unter anderem der ungekoppelte und der extra-mitochondriale Sauerstoffverbrauch. Auf diese Untersuchungen angewandt, errechnet sich ein Bedarf von etwa  $0,72 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7$  Zellen. Weiterhin besteht ein Bedarf für bisher unbekannte Prozesse. Aus dem Gesagtem ergibt sich kein wesentlicher Unterschied zu den für Probanden gefundenen Ergebnissen.

#### 3.1.3.3 Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung und aktiven Infektion

Für die Untersuchung ruhender PBMC von Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung und Infektion standen nur bei wenigen Patienten noch ausreichend Zellen zur Verfügung. Orientierende Untersuchungen waren ohne richtungsweisende Unterschiede zu den Ergebnissen die wir bei den Probanden bzw. Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung gefunden haben.

#### 3.1.3.4 Zusammenfassung

Schlußfolgernd ist festzustellen, daß sich PBMC von gesunden Probanden und Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung unter ruhenden Bedingungen, hinsichtlich der hauptenergieverbrauchenden Prozesse, qualitativ und prozentual nicht signifikant voneinander unterscheiden. In beiden Fällen sind als Hauptenergieverbraucher die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase und die Proteinsynthese zu identifizieren, während der ATP-Verbrauch für die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und die DNA/RNA-Synthese nicht nachweisbar war. Der prozentual nicht zuzuordnende Sauerstoffverbrauch ist in beiden Gruppen fast identisch.

### 3.1.4 Hauptenergieverbrauchende Prozesse in mitogen-stimulierten PBMC

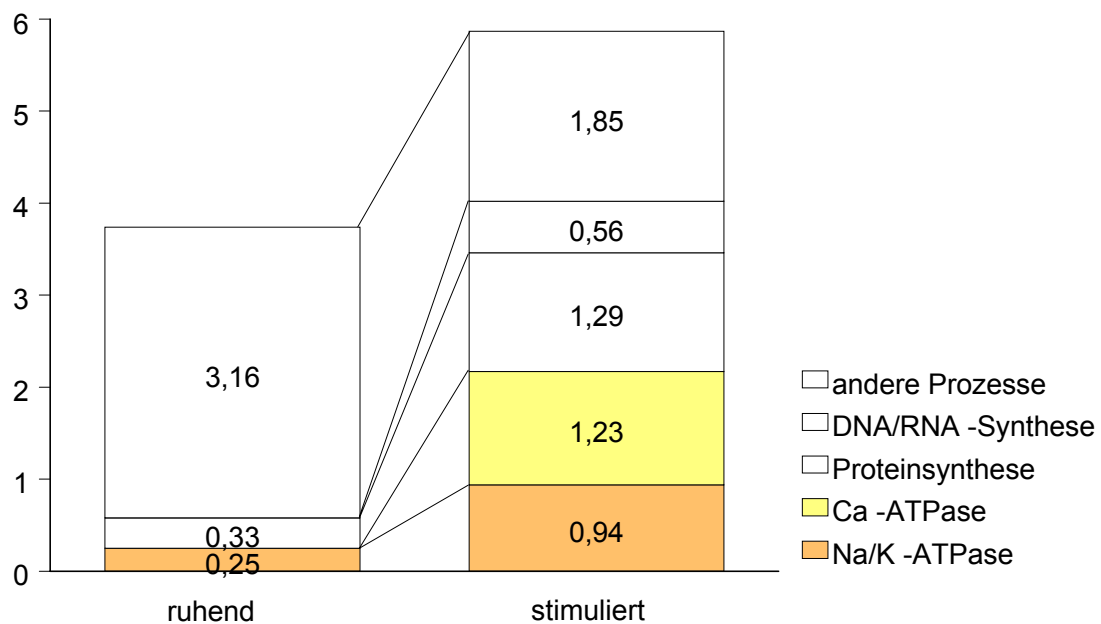
#### 3.1.4.1 Probanden

Die Ergebnisse haben gezeigt, daß sich die Stimulierbarkeit der PBMC zwischen den einzelnen Gruppen deutlich voneinander unterscheidet. Nach Untersuchung des bioenergetischen Profils von ruhenden PBMC, stellte sich die Frage, welche Unterschiede sich hinter der unterschiedlichen Stimulierbarkeit in den energieverbrauchenden Prozessen verbergen. Dazu haben wir nach der gleichen Methode den Verbrauch durch die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, Proteinsynthese und DNA/RNA-Synthese bestimmt. Diese Prozesse sind aus früheren Untersuchungen unter Con A Stimulation als Hauptenergieverbraucher bekannt. [Schmid et al. 2000; Buttgereit et al. 1991, 1992] Während ruhende PBMC nur von Probanden und Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung bilanziert wurden, erfolgte dagegen eine Bilanzierung von mitogen-stimulierten PBMC in allen Gruppen.

Im Kapitel 3.1.2 ist dargestellt, daß der Sauerstoffverbrauch unter Con A-Stimulation in allen Gruppen signifikant zunimmt. Im Anschluß daran wurde der Sauerstoffverbrauch nach mitogener Stimulation, durch Einsatz der selektiven Hemmstoffe, mit der beschriebenen Technik untersucht. Die Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse für PBMC von Probanden. Vergleichend sind Daten ruhender PBMC von Probanden angegeben.

Der Sauerstoffverbrauch der  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase und Proteinsynthese war absolut und relativ erhöht. Für die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und DNA/RNA-Synthese war nach Stimulation überhaupt erst ein Sauerstoffverbrauch meßbar. Der Anteil der anderen ATP-verbrauchenden Prozesse nahm nach Stimulation ab. Während man ruhenden PBMC von Probanden nur etwa 15,5% ihres Sauerstoffverbrauchs ATP-verbrauchenden Prozessen zuordnen kann, sind es bei stimulierten PBMC 68,5%. Damit bestätigen die an PBMC von Probanden gewonnenen Ergebnisse die Beobachtungen, welche an PBMC aus Buffy coats und an Rattenthymozyten gewonnen wurden. [Schmid et al. 2000; Buttgereit et al. 1991, 1992]

### Sauerstoffverbrauch (nmol O<sub>2</sub> / min / 10<sup>7</sup> Zellen)



**Abbildung 10:** Aufteilung des absoluten Sauerstoffverbrauchs ruhender und stimulierter PBMC von Probanden (n=30). Angegeben sind die MW.

Nach Stimulation entfielen anteilmäßig auf die Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase  $0,94 \pm 0,31$  nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen (16,01%), auf die Proteinsynthese  $1,29 \pm 0,46$  nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen (22%), auf die Ca<sup>2+</sup>-ATPase  $1,23 \pm 0,52$  nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen (21%) und auf die DNA/RNA-Synthese  $0,56 \pm 0,32$  nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen (9,5%). Der Verbrauch dieser Prozesse zusammen beträgt 4,02 nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen. Demnach können 1,85 nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen nicht zugeordnet werden. Das sind ca. 31,5% des Gesamtsauerstoffverbrauches unter Stimulation. Dahinter verbergen sich sowohl der ungekoppelte Sauerstoffverbrauch als auch das Protonenleak. Für den ungekoppelte Sauerstoffverbrauch wurde früher in unserem Labor ein Bedarf von 10,75% in stimulierten humanen PBMC bestimmt. [Schmid 2000] Daraus resultiert ein anteiliger Bedarf von etwa 0,63 nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen. Berücksichtigt man diesen Verbrauch zusätzlich, so verringert sich der nicht zu identifizierende Sauerstoffverbrauch auf etwa 1,22 nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen.

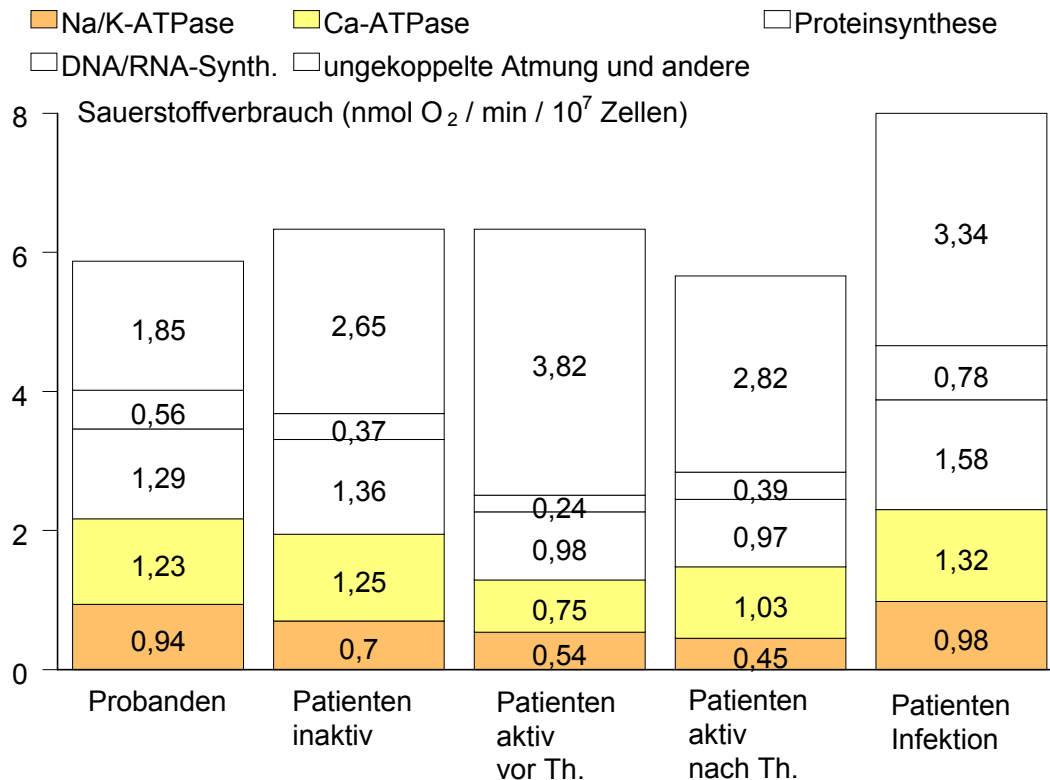
### 3.1.4.2 Patienten mit einer entzündlich-rheumatischen Erkrankung

Im weiteren wurden die Patienten mit einer inaktiven bzw. aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung, vor und nach Therapie, hinsichtlich des Sauerstoffverbrauchs durch die einzelnen Prozesse ( $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, Proteinsynthese und DNA/RNA-Synthese) unter mitogener Stimulation untersucht. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 11 dargestellt. Die Daten der Probanden wurden als Vergleich mit in die Abbildung aufgenommen.

Bei *Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung* entfielen anteilmäßig auf die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase  $0,7 \pm 0,79$  nmol  $\text{O}_2/\text{min}/10^7$  Zellen (11,1 %), auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase  $1,25 \pm 1,05$  nmol  $\text{O}_2/\text{min}/10^7$  Zellen (19,8 %), auf die Proteinsynthese  $1,36 \pm 0,87$  nmol  $\text{O}_2/\text{min}/10^7$  Zellen (21,5 %) und auf die DNA/RNA-Synthese  $0,37 \pm 0,56$  nmol  $\text{O}_2/\text{min}/10^7$  Zellen (5,8%). Zusammengefaßt können damit den hier bestimmten hauptenergieverbrauchenden Prozessen 3,68 nmol  $\text{O}_2/\text{min}/10^7$  Zellen an Sauerstoffverbrauch zugeordnet werden. 2,65 nmol  $\text{O}_2/\text{min}/10^7$  Zellen sind nicht identifizierbar. Das entspricht einem Wert von ca. 41,9%. Die PBMC unterscheiden sich nicht signifikant hinsichtlich ihres Sauerstoffbedarfes, durch die einzelnen Hauptenergieverbraucher, von den Probanden ( $p>0,05$ ).

Bei *Patienten mit einer aktiven Erkrankung vor Therapie* entfielen anteilmäßig auf die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase  $0,54 \pm 0,60$  nmol  $\text{O}_2/\text{min}/10^7$  Zellen (8,5%), auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase  $0,75 \pm 0,81$  nmol  $\text{O}_2/\text{min}/10^7$  Zellen (11,8%), auf die Proteinsynthese  $0,98 \pm 0,74$  nmol  $\text{O}_2/\text{min}/10^7$  Zellen (15,5%) und auf die DNA/RNA-Synthese  $0,24 \pm 0,32$  nmol  $\text{O}_2/\text{min}/10^7$  Zellen (3,8%). Damit können 2,51 nmol  $\text{O}_2/\text{min}/10^7$  Zellen zugeordnet werden. 3,82 nmol  $\text{O}_2/\text{min}/10^7$  Zellen sind nicht zu identifizieren. Das entspricht einem Wert von ca. 60,3%.

Der Sauerstoffbedarf der  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase ( $p=0,007$ ),  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ( $p=0,032$ ) und DNA/RNA-Synthese ( $p=0,011$ ) ist signifikant geringer, als bei Probanden. Für den Verbrauch durch die Proteinsynthese konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p=0,108$ ). Die Unterschiede zu den Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung sind in allen Fällen nicht signifikant ( $p>0,05$ ).



**Abbildung 11:** Aufteilung des absoluten Sauerstoffverbrauchs stimulierter PBMC von Probanden (n=30) und Patienten mit einer entzündlich-rheumatischen Erkrankung (inaktiv n=16, aktiv vor und nach Therapie n=12) und Infektion (n=5). Angegeben sind die MW.

*Nach Therapie* entfielen anteilmäßig auf die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase  $0,45 \pm 0,88 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  (8,0%), auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase  $1,03 \pm 1,02 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  (18,2%), auf die Proteinsynthese  $0,97 \pm 0,93 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  (17,1%) und auf die DNA/RNA-Synthese  $0,39 \pm 0,71 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  (6,9%). Damit können  $2,84 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  zugeordnet werden.  $2,82 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  sind nicht identifizierbar. Das entspricht einem Wert von 49,8%. Die aufgetretenen Änderungen sind jedoch im Vergleich zum Zeitpunkt vor Therapiebeginn statistisch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).



### 3.1.4.3 Zusammenfassung

Aus diesen Ergebnissen ergeben sich für den Sauerstoffverbrauch, der hier untersuchten hauptenergieverbrauchenden Prozesse in mitogen-stimulierten PBMC von Patienten mit entzündlich-rheumatisch Erkrankungen im Vergleich zu Gesunden folgende Schlußfolgerungen:

*1. Der Sauerstoffverbrauch für die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, Proteinsynthese sowie DNA/RNA-Synthese ist bei aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankungen in mitogen-stimulierten PBMC im Vergleich zu untersuchten Zellen der Kontrollgruppe der Probanden vermindert.*

Der absolute Bedarf der Hauptenergieverbraucher am Gesamtsauerstoffverbrauch ist in PBMC von Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung gegenüber Probanden nicht signifikant verändert. Dagegen ist er bei PBMC von Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung vor Therapie für die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und DNA/RNA-Synthese signifikant und für die Proteinsynthese nicht signifikant vermindert. Nach Therapie und damit Verminderung der Entzündungsaktivität nahm der Verbrauch durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, Proteinsynthese sowie DNA/RNA-Synthese nicht signifikant zu. Der Verbrauch durch die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase nahm weiterhin ab.

In der Summe erreichten diese Prozesse nicht die Höhe des Verbrauchs, als bei PBMC von Probanden und Patienten mit einer inaktiven Erkrankung.

*2. Mit zunehmender Krankheitsaktivität nimmt der Sauerstoffverbrauch für solche Prozesse zu, die nicht zu den Hauptenergieverbrauchern gehören.*

Die typischen Haupt-ATP-Verbraucher verwenden nach Stimulation bei Probanden etwa 4,02 nmol  $\text{O}_2/\text{min}/10^7$  Zellen (68,5%) der Energie. Bei Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung werden durch sie nur 3,68 nmol  $\text{O}_2/\text{min}/10^7$  Zellen (58,1%) und bei einer aktiven Erkrankung vor Therapie nur noch 2,51 nmol  $\text{O}_2/\text{min}/10^7$  Zellen (39,7%) der Energie verstoffwechselt. Nach Therapie nimmt ihr Verbrauch mit 2,84 nmol  $\text{O}_2/\text{min}/10^7$  Zellen (50,2%) wieder zu. In der Abbildung 12 ist der Sauerstoffverbrauch durch die 4 untersuchten Hauptenergieverbraucher vergleichend zu anderen sauerstoffverbrauchenden Prozessen einschließlich der ungekoppelten Atmung dargestellt. Da der Verbrauch für die ungekoppelte Atmung in unserem Labor mit ca. 10,75% bestimmt wurde, können wir diesen für die einzelnen

Gruppen näherungsweise errechnen. In der Abbildung 13 ist der uns bekannte Verbrauch der Hauptenergieverbraucher einschließlich ungekoppelter Atmung, vergleichend zu dem Verbrauch anderer, durch uns nicht bestimmbarer Prozesse, dargestellt.

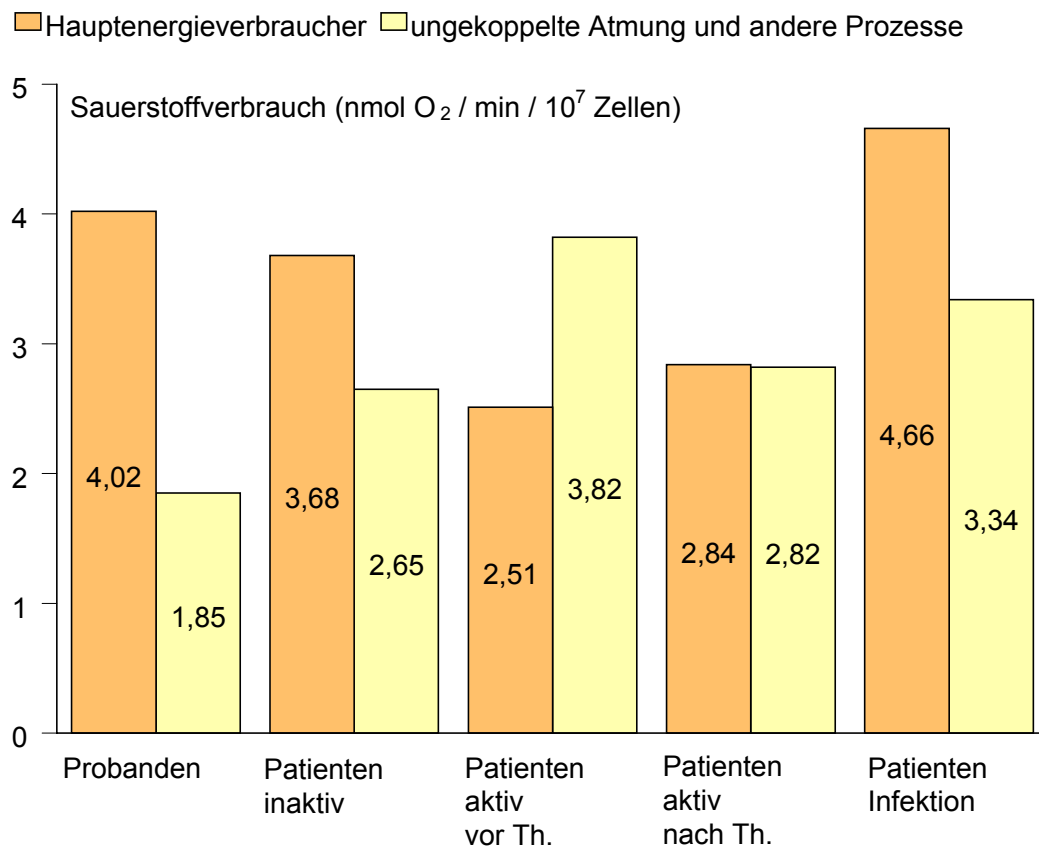


Abbildung 12: Sauerstoffbedarf der Hauptenergieverbraucher vergleichend zum Umfang der ungekoppelten Atmung und anderer sauerstoffverbrauchender Prozesse mitogen-stimulierter PBMC von Probanden (n=30), sowie Patienten mit einer entzündlich-rheumatischen Erkrankung (inaktiv n=16, aktiv vor und nach Therapie n=12) oder Infektion (n=5).

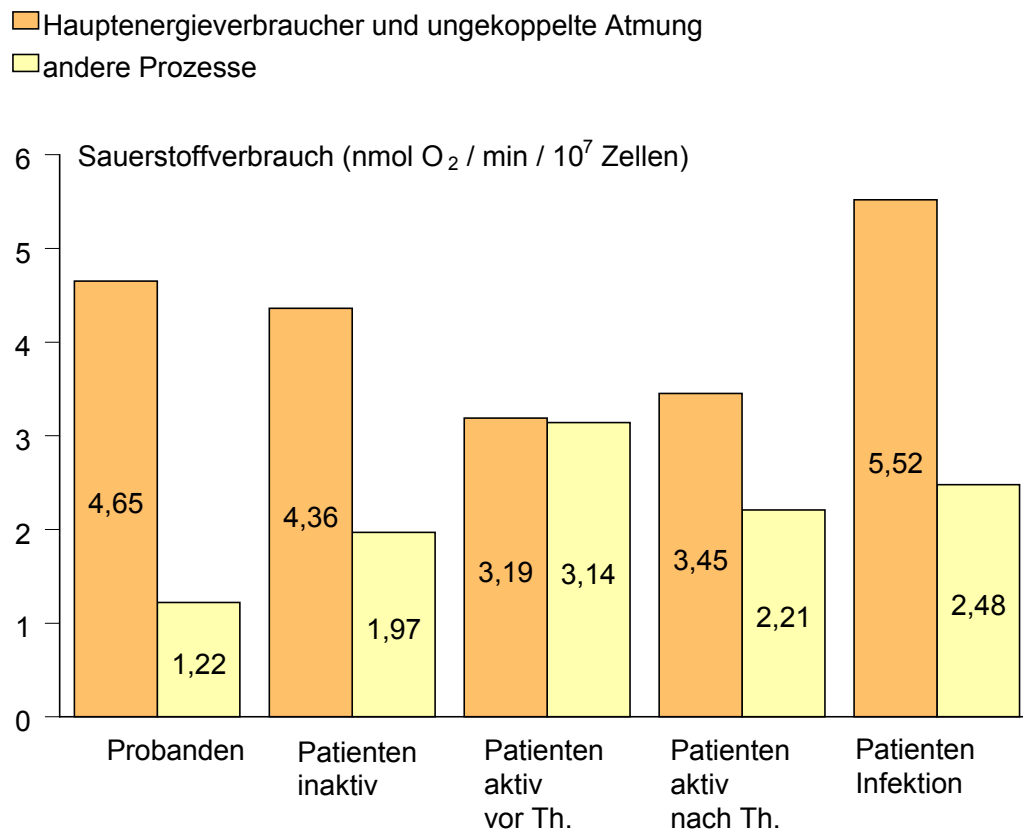


Abbildung 13: Sauerstoffbedarf der Hauptenergieverbraucher, einschließlich des errechneten ungekoppelten Sauerstoffverbrauchs von 10,75%, vergleichend zum Umfang der anderen sauerstoffverbrauchenden Prozesse mitogen-stimulierter PBMC von Probanden und Patienten mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen oder Infektionen.

*Damit läßt sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit ableiten, daß sich die Aktivität entzündlich - rheumatischer Erkrankungen offenbar im PBMC Energiestoffwechsel reflektiert.*

*Kennzeichnend für Krankheitsaktivität ist der Anstieg von Prozessen, die nicht zu den Hauptenergieverbrauchern gehören.*

#### 3.1.4.4 Patienten mit einer akuten Infektion vor Therapiebeginn

Bei Patienten mit einer akuten Infektion vor Therapiebeginn entfielen auf die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase  $0,98 \pm 1,21 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  (12,3%). Dieser Wert ist ohne signifikanten Unterschied zu dem der Probanden ( $p=0,913$ ). Die Streuung der einzelnen Werte ist, allerdings im Unterschied zu allen anderen Gruppen, sehr groß. So konnte bei 2 Patienten kein signifikanter Verbrauch bestimmt werden, während er bei den anderen 3 Patienten mit 1,69 / 2,16 und 1,71  $\text{nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  deutlich höher, als in den anderen Gruppen, war.

Ähnlich verhielt es sich bei dem Sauerstoffverbrauch durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Es wurde in dieser Gruppe ein Verbrauch von  $1,32 \pm 0,92 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  (16,5%) bestimmt. Dieser Wert liegt im Bereich des für PBMC von Probanden bestimmten und unterscheidet sich nicht signifikant von diesen ( $p=0,753$ ). Ein signifikanter Sauerstoffverbrauch war in allen Fällen nachweisbar, ebenfalls mit einer hohen Streubreite. So betrugen die einzelnen Werte 2,15 / 0,32 / 2,05 / 0,32 und 1,76  $\text{nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$ .

Auf die Proteinsynthese entfielen durchschnittlich  $1,58 \pm 0,75 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  (19,8%). Dieser Wert ist nicht signifikant höher ( $p=0,236$ ) als der Wert, der für PBMC von Probanden ermittelt wurde. Die Werte der fünf untersuchten Patienten betrugen 2,06 / 1,06 / 2,24 / 0,52 und 2,02  $\text{nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  und weisen eine große Streuung auf.

Für die DNA/RNA-Synthese wurde ein durchschnittlicher Verbrauch von  $0,78 \pm 0,73 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  ermittelt (9,8%). Somit ist auch dieser Wert höher, aber ohne signifikanten Unterschied ( $p=0,253$ ) zu dem der für PBMC von Probanden ermittelt wurde. Bei einem Patienten konnte kein signifikanter Sauerstoffverbrauch bestimmt werden und in den anderen Fällen betrug er 1,54 / 0,26 / 1,32 und 0,99  $\text{nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$ . Die Ergebnisse wurden bereits in der Abbildung 3.10 dargestellt. In dieser Gruppe sind 4,66  $\text{nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  des Sauerstoffverbrauchs den Hauptenergieverbrauchern zuzuordnen. 3,34  $\text{nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  sind nicht identifizierbar. Das entspricht einem Wert von ca. 41,7%.

Vergleichend zu den Hauptenergieverbrauchern von Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung lassen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ableiten ( $p>0,05$ ). Die Ergebnisse sind auf Grund der kleinen Zahl der untersuchten Patienten und großen Streubreite mit Zurückhaltung zu bewerten, berechtigen aber doch zur Ableitung der zuvor genannten Schlußfolgerungen. Hier müssen weitere Untersuchungen folgen.

### 3.2 *Glukokortikoideffekt auf die Expression der cAMP-spezifische PDE in humanen PBMC*

#### 3.2.1 Isolierung und Gelanalyse der Gesamt-RNA

Nachdem die RNA isoliert wurde, erfolgte eine qualitativ-optische Überprüfung der Proben mittels gelelektrophoretischer Auftrennung in einem 1 %igen Agarosegel. Die Abbildung 14 zeigt exemplarisch die zu erwartenden 18 S- und 28 S-rRNA-Banden.

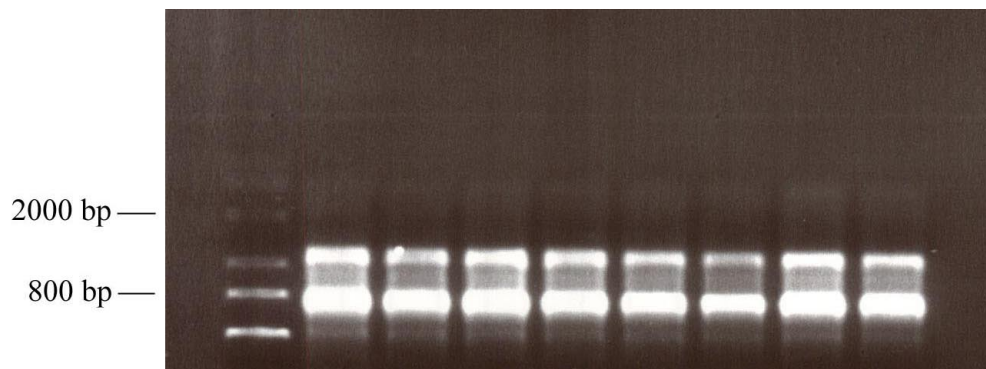


Abbildung 14: Auftrennung der isolierten Gesamt-RNA einer Probe in einem 1%igen Agarosegel.

Anschließend erfolgte stets eine photometrische Reinheits- und Ausbeutebestimmung der gewonnenen RNA. Für die Konzentrationsberechnung wurde das mittlere Absorptionsmaximum bei 260 nm herangezogen. Der Reinheitsfaktor errechnete sich über den Quotienten  $A_{260} / A_{280}$ . Die spektralphotometrische Auswertung ergab für alle extrahierten RNA-Proben einen Reinheitsfaktor von  $> 1,7$ .

### 3.2.2 Einfluß von Glukokortikoiden auf die cAMP-spezifische PDE

#### 3.2.2.1 Einfluß von Prednyliden und Dexamethason auf die cAMP-spezifische PDE

Es wurde der Einfluß von Prednyliden und Dexamethason auf die cAMP-spezifische PDE-Expression in PBMC mittels semiquantitativer PCR untersucht. Dazu wurden die PBMC vor Isolierung ihrer Gesamt-RNA mit und ohne Glukokortikoid für die verschiedenen Zeiten inkubiert. Die PBMC-Inkubation erfolgte für Prednyliden für 5, 30, 60, 90 und 120 Minuten und mit Dexamethason für 5, 60 und 120 Minuten.

Die Abbildung 15 zeigt exemplarisch die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte, bei einer Inkubationsdauer von 5, 30, 60, 90 und 120 Minuten für Prednyliden, im Vergleich zu Proben ohne Prednylideninkubation in einem 1 %igem Agarosegel. Für die GAPDH-Sequenzen ist der 28. Zyklus aufgetragen. Für die cAMP-spezifischen PDE-Sequenzen der 34. Zyklus. Um auf eine vergleichbare Effizienz der Amplifikation beider Primerpaare schließen zu können, wurden stets die Zyklen ausgewählt, die im linearen Bereich der PCR lagen und damit zum Vergleich der Proben verwendbar waren. Zu diesen Bedingungen wurden 3 PCR durchgeführt. Die Auswertung erfolgte stets als Doppelbestimmung aus 2 Gelen.

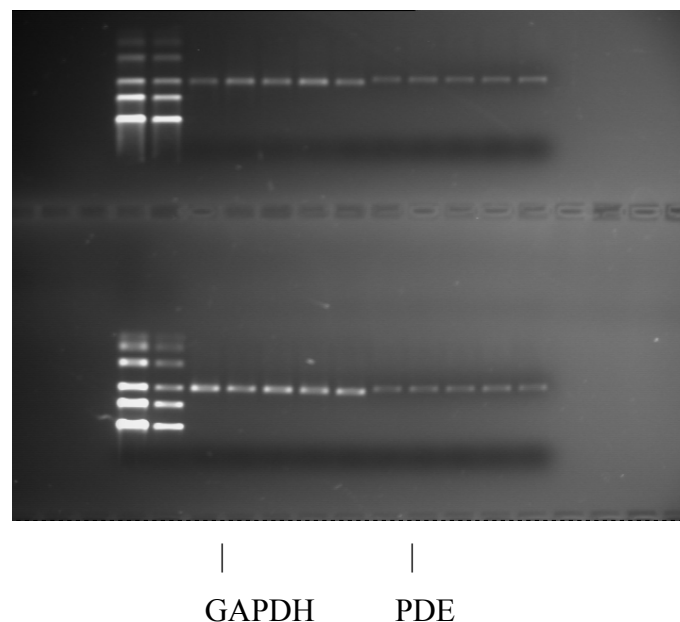


Abbildung 15: Gel mit den Banden der GAPDH nach dem 28.Zyklus und der cAMP-spezifischen PDE nach dem 34. Zyklus bei 800 bp. Aufgetragen sind jeweils hintereinander die Proben für 5, 30, 60, 90 und 120 min. In der oberen Reihe sind die Proben mit Prednylideninkubation und in der unteren Reihe ohne Prednylideninkubation zu sehen.

Nach Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel erfolgte die densitometrische Auswertung der ethidiumbromidgefärbten Banden und ein Abgleich auf die GAPDH-Sequenzen. Anschließend wurden die Mengen, die für die cAMP-spezifischen PDE-Sequenzen kodieren, zwischen den Proben mit und ohne Glukokortikoidinkubation sowie im Zeitverlauf verglichen. Dabei konnte keine signifikante Änderung der Expression der cAMP-spezifischen PDE zwischen den Proben mit und ohne Glukokortikoidinkubation nachgewiesen werden. Desweiteren ergab sich unter Glukokortikoidinkubation keine signifikante Änderung im Zeitverlauf über 120 Minuten. Dieses Ergebnis konnte im selben Zellansatz mit 2 weiteren PCR reproduziert werden. Die Inkubation der PBMC mit dem Glukokortikoid Dexamethason für 5, 60 und 120 min erfolgte in 2 weiteren Zellansätzen mit je 2 PCR. Sie ebenfalls ohne Effekt auf die Expression der cAMP-spezifischen PDE.

### 3.2.3 Spezifitätsnachweis

Um Hinweise auf die Spezifität der PCR zu erhalten, wurden die PCR-Produkte mit Restriktionseendonukleasen verdaut. In der Tabelle 4 sind die PCR-Produkte, ihre Länge in Basenpaaren, die verwendeten Restriktionseendonukleasen, sowie die Länge der größten resultierenden Fragmente in Basenpaaren aufgeführt. In der Abbildung 16 sind die amplifizierten PCR-Produkte sowie die durch den Verdau entstandenen DNA-Fragmente dargestellt. Da die PCR-Produkte und Restriktionsfragmente die vorausgesagten Längen aufweisen, legt das die Spezifität der für beide Primerpaare durchgeführten PCR nahe.

Tabelle 4: PCR-Produkte, verwendete Restriktionseendonukleasen sowie Längen der PCR-Produkte und Restriktionsfragmente in Basenpaaren (bp)

PCR-Produkte	Amplifikatlänge (in bp)	Restriktionsenzyme	Fragmentlängen (in bp)
cAMP-spezifische	730	Pst I	178 / 552
PDE		NcoI	307 / 423
GAPDH	797	Hind III	601 / 196
		Hinf I	277 / 211 / 161

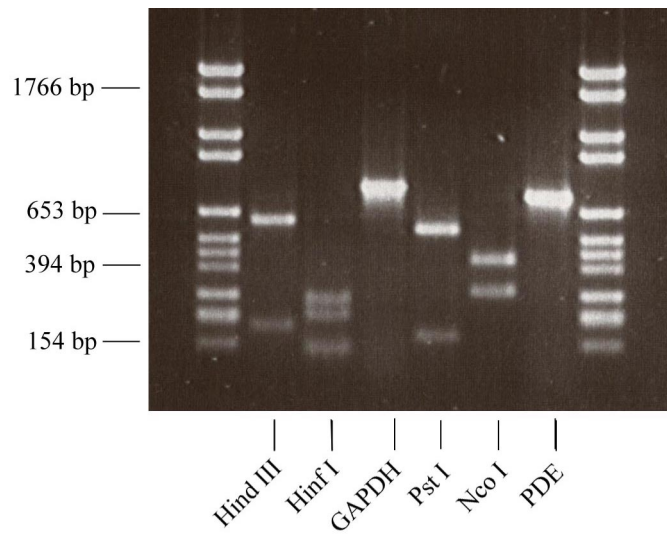


Abbildung 16: Auftrennung der DNA-Fragmente nach der Verdauung mit Restriktionsendonukleasen zum Spezifitätsnachweis der PCR. Auf den Spuren 2-4 sind die Restriktionsfragmente des GAPDH durch Hind III und Hinf I sowie das unverdaute Produkt der GAPDH dargestellt. Auf den Spuren 5-7 sind die Restriktionsfragmente der cAMP-spezifischen PDE durch Pst I und Nco I sowie das unverdaute Produkt der cAMP-spezifischen PDE aufgetragen. In der Spur 1 und 8 befindet sich zur Orientierung der DNA Molecular Weight Marker IV. (La Roche, Mannheim, Deutschland)



## **4 Diskussion**

### **4.1 *PBMC-Lymphozyten***

Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurden humane, aus Vollblut präparierte, periphere mononukleäre Zellen des Blutes (PBMC) verwendet. Diese setzen sich aus mindestens 80-90% Lymphozyten zusammen. Der restliche Anteil der PBMC besteht aus Granulozyten und Monozyten. Es wurde bewußt auf eine Zellseparierung verzichtet, da als Voraussetzung für eine optimale Stimulierung von T-Lymphozyten notwendige Zell-Zell-Kontakte zwischen den einzelnen PBMC-Fraktionen beschrieben wurden [Zempleni et al. 1999; Karlsson et al. 1997; Meskini et al. 1992].

Die Lymphozyten lassen sich in die Fraktionen der T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Natürliche-Killer-Zellen (NK-Zellen) unterteilen. In der Regel haben die mit ca. 75% vorkommenden T-Lymphozyten den größten Anteil, gefolgt von B-Lymphozyten mit ca. 15% und NK-Zellen mit ca. 10% [Janeway et al. 1997; Hatz et al. 1998]. Daraus ergibt sich, daß unsere hergestellte Zellsuspension zum überwiegenden Teil T-Lymphozyten enthielt.

T-Lymphozyten sind Vermittler der zellulären Immunität. Sie stammen von pluripotenten Zellen des Knochenmarks ab. Vorläufer T-Zellen wandern in den Thymus aus und werden dort immunologisch geprägt. Im wesentlichen unterscheidet man sie durch die Expression von Corezeptoren des CD3<sup>+</sup> T-Zell-Rezeptorkomplexes in CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen und CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen. Die CD4<sup>+</sup>-Zellen regen B-Lymphozyten zur Antikörperbildung an. Desweiteren fördern sie die Produktion spezieller Mediatorstoffe (z.B. INF- $\gamma$ ) und die zytotoxische Aktivität von CD8<sup>+</sup>-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen. Sie spielen damit eine zentrale Rolle bei entzündlichen, bakteriellen und parasitären Immunantworten. CD8<sup>+</sup>-Zellen vermitteln ihre Immunantwort durch zellmembranzerstörende Perforine oder auch durch Auslösung von Apoptose. Ihre Bedeutung liegt vor allem in der Abwehr viraler Infektionen und in der Bekämpfung von Tumoren.

B-Lymphozyten reifen ein Leben lang im Knochenmark und sind für die spezifisch humorale und sekundäre Abwehr zuständig. Nach Kontakt mit Antigenen können sie sich in Antikörpersezernierende Plasmazellen umwandeln.

NK-Zellen sind lymphatische Nicht-T-Nicht-B-Zellen und auf die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität spezialisiert. [Janeway et al. 1997]

## **4.2 Energiestoffwechsel in ruhenden PBMC**

### **4.2.1 Gesamtsauerstoffverbrauch**

Die anhand des Untersuchungsmodells gewonnenen Ergebnisse sind von den gewählten Versuchsbedingungen (Temperatur, Zeit der Äquibrilierung mit Sauerstoff), vom Inkubationsmedium der Zellen, d.h. den zugegebenen Substraten wie Aminosäuren und Glukose, sowie von der Menge der eingesetzten Hemmstoffe abhängig. Die genannten Versuchsbedingungen sind in der Vergangenheit an verschiedenen Zellsystemen getestet und optimiert worden und kamen so für die Untersuchungen in dieser Arbeit zur Anwendung. [Schmid et al. 2000; Buttgereit et al. 1992, 1991; Müller et al. 1986]

In dieser Arbeit wurde erstmalig der Normalbereich für den Gesamtsauerstoffverbrauch von frisch aus Vollblut präparierten PBMC bei Probanden bestimmt. Dabei konnte festgestellt werden, daß es zwischen männlichen und weiblichen Probanden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Gesamtsauerstoffverbrauchs gibt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen darüber hinaus, daß die PBMC von gesunden Probanden den geringsten Gesamtsauerstoffverbrauch haben. Dieser erhöht sich bei PBMC von Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung und nimmt weiter bei PBMC von Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung zu. PBMC von Patienten mit einer aktiven Infektion vor Therapiebeginn haben in unseren Untersuchungen den höchsten Gesamtsauerstoffverbrauch aller Gruppen. Damit gelang es anhand dieser Arbeit erstmalig zu zeigen, daß sich die Aktivität des Immunsystems auf zellulärer Ebene in der Atmung von PBMC niederschlägt. Der Gesamtsauerstoffverbrauch verändert sich offenbar in Abhängigkeit von der klinisch und laborchemisch eingeschätzten Aktivität entzündlich-rheumatischer und infektiöser Erkrankungen. Er erhöht sich mit zunehmender Krankheitsaktivität. Daher scheint sich der Gesamtsauerstoffverbrauch frisch aus Vollblut präparierter PBMC als ein guter Parameter zur Beurteilung der Aktivität des Immunsystems und somit auch von Krankheitsaktivität zu eignen.

Wie können diese Befunde erklärt werden?

Die Gruppe der Probanden steht für eine gesunde Population von Individuen mit einem normal aktivierten Immunsystem und repräsentiert mit  $3,84 \pm 0,1 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  einen Normalbereich für den Gesamtsauerstoffverbrauch von PBMC.

Bei den Patientengruppen mit einer inaktiven bzw. aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung ist grundsätzlich eine Autoimmunerkrankung mit einer ständigen Präsentation von Autoantigenen (körpereigene Proteine) vorhanden. Aus dieser resultiert eine chronische Aktivierung von T-Lymphozyten, die wiederum das Krankheitsgeschehen unterhält [Yocum et al. 1999; Van Noort et al. 1998]. Außerdem kommt es zu einem erhöhten Anteil autoimmun-aktivierter oder stimulierter Lymphozyten innerhalb der PBMC [Erkeller-Yüksel et al. 1993]. Diese Tatsache ist offenbar Ursache für unseren Befund, und daher konnten wir gegenüber Probanden einen nicht-signifikant erhöhten Gesamtsauerstoffverbrauch von  $4,18 \pm 0,28 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  bei PBMC von Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung und einen signifikant erhöhten Gesamtsauerstoffverbrauch von  $4,82 \pm 0,33 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  bei PBMC von Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung nachweisen. Der Gesamtsauerstoffverbrauch von PBMC unterscheidet sich somit innerhalb der Gruppe entzündlich-rheumatisch erkrankter Patienten und erhöht sich, wie in der Arbeitshypothese angenommen, mit zunehmender Aktivität der Erkrankung.

Die Patienten mit einer akuten Infektion vor Therapiebeginn stehen für eine Gruppe von bisher gesunden Individuen, die seit kurzem an einer aktiv verlaufenden Infektion leiden. Sie repräsentieren damit Patienten mit einem bisher völlig intaktem Immunsystem, welches daher adäquat zur Abwehr der Erreger reagieren sollte. Bedingt durch die Präsentation des infektiösen Agens sind die Lymphozyten aktiviert. Das schlägt sich in der vorliegenden Arbeit bei diesen Patienten im Gesamtsauerstoffverbrauch der PBMC nieder. Er beträgt  $5,1 \pm 0,29 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  und ist damit deutlich höher als bei Probanden. Interessanterweise ist der Gesamtsauerstoffverbrauch sogar noch höher als bei Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung. Einschränkend ist jedoch festzustellen, daß die untersuchte Gruppe nur orientierend im Sinne einer Pilotstudie untersucht worden ist und somit aus einer recht geringen Anzahl von Patienten besteht. Der Unterschied zwischen Patienten mit einer aktiven Infektion und Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung könnte möglicherweise durch eine unterschiedliche Dauer der Auseinandersetzung des Immunsystems mit dem antigenen Stimulus begründet sein. Bei Patienten mit einer akuten Infektion trat die Aktivierung neu durch die Infektion auf. Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung befinden sich im Schub und damit in einer Phase einer starken Aktivierung des Immunsystems. Im Unterschied zu den Infektionspatienten liegt aber eine latente und chronische Stimulierung des Immunsystems vor. Das wurde in den Ergebnissen im höheren Gesamtsauerstoffverbrauch der Patienten mit einer inaktiven Erkrankung sichtbar. Vielleicht ist das Immunsystem dieser Patienten, bedingt durch eine chronische Auseinandersetzung mit dem antigenen Agens, nicht mehr in gleicher

Weise in der Lage zu reagieren. In jedem Fall sollen zur Klärung dieser Frage weitere Untersuchungen an PBMC von Patienten mit akuten Infektionen folgen.

Wie wir also in dieser Arbeit gezeigt haben, ist der durch die Krankheitsaktivität erhöhte Energiebedarf der PBMC als erhöhter Gesamtsauerstoffverbrauch meßbar. Sicherlich bedingen eine Reihe verschiedener Prozesse den erhöhten Energiebedarf. So ist bekannt, daß Lymphozyten Energie zum einem für zelleigenen Funktionen, insbesondere für den Kationentransport und die Makromolekülsynthese, benötigen. Diese Prozesse sind von elementarer Bedeutung für das Überleben und Funktionieren der einzelnen Zelle, da sie durch sie das Zellvolumen regulieren und Zellwachstum steuern können. Desweiteren benötigen Lymphozyten aber auch Energie für ihre immunspezifischen Aufgaben. Dazu zählen unter anderem der Energieverbrauch für Zytokinese, Aktivierungsvorgänge, Antikörpersynthese oder auch Zytotoxizität. Granulozyten und Monozyten benötigen neben ihren Energiebedarf zur Aufrechterhaltung zelleigener Funktionen, Energie für immunspezifische Aufgaben. So verbrauchen sie Energie für Migrationsprozesse, Phagozytose oder für die Antigenverarbeitung und -präsentation [Buttgereit et al. 2000].

#### 4.2.2 Hauptenergieverbrauchende Prozesse

Wie bereits festgestellt wurde, spiegelt der Gesamtsauerstoffverbrauch die Aktivität von zellulären energieverbrauchenden Prozessen wider. Um die gefundenen Unterschiede im Gesamtsauerstoffverbrauch zwischen den untersuchten Gruppen genauer analysieren zu können, war die Untersuchung der einzelnen Energieverbraucher nötig.

Als Hauptenergieverbraucher wurden in der Vergangenheit durch Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an Lymphozyten als wichtige ATP-verbrauchende Prozesse die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, Proteinsynthese und DNA/RNA-Synthese identifiziert. Durch diese Prozesse sind für die Zelle elementare Funktionen wie Ionentransporte und Makromolekülsynthese gewährleistet. Der Energieumsatz durch sie kommt sowohl zelleigenen, als auch immunspezifischen Funktionen zugute [Buttgereit et al. 2000]. Die Untersuchungen wurden an verschiedenen Zellsystemen durchgeführt. So wurden beispielsweise Splenozyten vom Schwein (B-Lymphozyten), Rattenthymozyten (T-Lymphozyten) [Buttgereit et al. 1991, 1992] und PBMC gesunder Spender aus Buffy coats untersucht [Schmid et al. 2000]. Aufbauend auf diesen Arbeiten wurden die genannten Prozesse nun erstmals an frisch aus Vollblut präparierten PBMC von Patienten mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen bestimmt. Die Gruppe der Probanden und Patienten mit einer

inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung wurde unter ruhenden Bedingungen bilanziert. Das heißt, es wurde der Verbrauch durch die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase, Proteinsynthese,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und DNA/RNA-Synthese auf den Gesamtsauerstoffverbrauch aufschlüsselnd ermittelt.

Der Sauerstoffverbrauch durch die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase betrug bei PBMC von Probanden  $0,25 \pm 0,15$  nmol  $\text{O}_2/\text{min}/10^7$  Zellen (6,7%). Bei PBMC von Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung war der Verbrauch mit  $0,33 \pm 0,46$  nmol  $\text{O}_2/\text{min}/10^7$  Zellen (7,7%) nicht-signifikant höher. Somit konnte in beiden Gruppen ein in etwa gleich großer Sauerstoffbedarf für die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase festgestellt werden.

Die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase ist ein Transmembranprotein, welches in Plasmamembranen lokalisiert ist. Sie pumpt  $\text{Na}^+$  aus der Zelle heraus und  $\text{K}^+$  in die Zelle hinein, während gleichzeitig intrazelluläres ATP hydrolysiert wird. Sie dient der osmotischen Kontrolle des Zellwassergehaltes.

Es ist seit langem bekannt, daß Ouabain (g-Strophanthin) die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase-Aktivität hemmt [Voet et al. 1992; Grinstein et al. 1989] und es wurde daher zur selektiven Blockierung dieser eingesetzt. Ouabain ist ein Wirkstoff, der aus den Blättern des Roten Fingerhuts gewonnen wird. Es hemmt die ATPase, indem es eine starke Bindung mit einem auf der Außenseite liegenden Teil des Enzyms eingeht und den transmembranösen  $\text{Na}^+$ -Durchtritt nach extrazellulär verhindert. Vergleichend zu Untersuchungen an humanen PBMC aus Buffy coats konnten der  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase 8% des Gesamtsauerstoffverbrauchs zugeordnet werden. Dieser Verbrauch scheint somit in humanen PBMC einen sehr stabilen Bedarf für die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase zu reflektieren.

Der Sauerstoffverbrauch durch die Proteinsynthese betrug bei PBMC von Probanden  $0,33 \pm 0,18$  nmol  $\text{O}_2/\text{min}/10^7$  Zellen (8,8%) und bei PBMC der Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung  $0,38 \pm 0,26$  nmol  $\text{O}_2/\text{min}/10^7$  Zellen (8,9%). Damit war auch hier in beiden Gruppen ein signifikanter Sauerstoffverbrauch feststellbar. Vergleichend zwischen beiden Gruppen ist der Verbrauch jedoch ohne signifikanten Unterschied. Damit ist für diesen Prozeß kein deutlich erhöhter Mehrbedarf bei PBMC von Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung nachweisbar. Jeder Organismus oder jede Zelle enthält sehr viele Proteine mit unterschiedlichsten Funktionen. Diese Proteine werden beispielsweise als Biokatalysatoren (Enzyme), als Signalstoffe (z.B. Proteohormone), zur Abwehr als  $\gamma$ -Immunglobuline, als Transportproteine (z.B. Albumin) oder Strukturproteine gebildet. Jede Zelle synthetisiert also ständig spezifische Proteine anhand ihrer genetischen Information. Durch die Translation wird

die mRNA in die Aminosäuresequenz der Proteine übersetzt. Während der Translation inhibiert der eingesetzte Hemmstoff Cycloheximid die Peptidyl-Transferase, welche auf den Ribosomen die Übertragung der Peptidkette im Prozeß der Kettenverlängerung katalysiert. [Voet et al. 1992] Der Energiebedarf der Proteinsynthese ist hoch und wird ebenfalls durch Hydrolyse energiereicher Phosphatverbindungen bereitgestellt. Wie bereits in vorangegangenen Untersuchungen an humanen PBMC aus Buffy coats konnten hier der Proteinsynthese 8% des Gesamtsauerstoffverbrauchs zugeordnet werden. Damit scheint der Verbrauch für die Proteinsynthese in humanen PBMC einen sehr stabilen Bedarf an Energie zu besitzen.

Im Gegensatz zum Verbrauch durch die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase und Proteinsynthese war in beiden Gruppen in ruhenden PBMC für die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase sowie DNA/RNA-Synthese kein meßbarer Sauerstoffverbrauch zu bestimmen.

Die  **$\text{Ca}^{2+}$ -ATPase** ist ebenfalls ein Transportprotein und ist in Plasmamembranen und im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert.  $\text{Ca}^{2+}$  fungiert als universaler second messenger und triggert zahlreiche Reaktionen in den Zellen, einschließlich der Ionentransporte, Bewegungen, Sekretion und Proliferation [Eyster et al. 1998; Grinstein et al. 1989]. Die Konzentration von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im Cytoplasma ist sehr gering und wird durch die ATP-abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ständig niedrig gehalten. Ein plötzlicher Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$  Spiegels durch Öffnung von  $\text{Ca}^{2+}$  Kanälen, die sich in der Plasmamembran oder in der Membran von  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern innerhalb der Zelle befinden, kann durch Signalstoffe ausgelöst werden. Ein Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt jedoch zur Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Deren Aufgabe ist das Herauspumpen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus der Zelle, um den Ausgangswert wieder herzustellen bzw. konstant zu halten.

Extrazelluläre Lanthan-Ionen blockieren kompetitiv membranständige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, ohne selbst die Zellmembran zu penetrieren [Kiss et al. 1994; Segal et al. 1986; Gorman et al. 1980]. Infolge dessen wird die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase funktionslos und auf indirekte Weise gehemmt.

In ruhenden PBMC zeigte sich in beiden Gruppen kein Hemmeffekt nach Zugabe von Lanthan. Somit konnte keine signifikante Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase nachgewiesen werden. Im Gegenteil, es kam zu einer Zunahme des Sauerstoffverbrauchs nach Lanthanzugabe. Weshalb es zur Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs der ruhenden PBMC kommt, konnte bisher nicht restlos geklärt werden. Neben der Hemmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transports wurde in der Vergangenheit für Lanthan auch die Fähigkeit zur Erhöhung der gekoppelten Atmung beschrieben. Möglicherweise steht die

gemessene Zunahme des Gesamtsauerstoffverbrauchs im Zusammenhang mit dieser Wirkung. [Grivennikova et al. 1994] Das Ergebnis dieser Arbeit steht in Übereinstimmung mit Untersuchungen an humanen PBMC aus Buffy coats und anderen Zellsystemen. [Schmid et al. 2000; Buttgereit et al. 1992]

Für die **DNA/RNA-Synthese** konnte in ruhenden PBMC beider Gruppen ebenfalls kein signifikanter Sauerstoffverbrauch bestimmt werden. Damit konnten die Beobachtungen, welche an ruhenden PBMC aus Buffy coats und an Rattenthymozyten gewonnen wurden, reproduziert werden. [Schmid et al. 2000; Buttgereit et al. 1992] Offenbar synthetisieren ruhende PBMC zu Reparaturzwecken nur so wenig DNA und RNA [Carson et al. 1986; Seto et al. 1986; Kay et al. 1972], daß der Prozeß mit der angewandten Technik, aufgrund des geringen Umfangs, nicht erfaßt werden konnte. [Schmid et al. 2000] Jede Zelle synthetisiert ständig spezifische Proteine anhand ihrer genetischen Information. Nukleinsäuren sind für die Speicherung (Gene in Form von DNA) und Verarbeitung (u.a. messenger-, transfer-, ribosomale RNA) der genetischen Information von entscheidender Bedeutung. Zur Expression eines Gens, d.h. zur Synthese des entsprechenden Proteins, muß die Sequenzinformation der DNA in eine Proteinsequenz umgesetzt werden. Da die DNA nicht selbst an der Proteinsynthese teilnimmt, wird die Information aus dem Zellkern zum Ort der Proteinsynthese, den Ribosomen übertragen. Dazu wird zunächst durch Transkription der relevante Teil des Gens in eine messenger-RNA (mRNA) umgeschrieben. Das Antibiotikum Actinomycin D hemmt diesen Schritt, indem es die DNA interkaliert, d.h. sich zwischen zwei Basenpaare schiebt und somit das Ablesen der DNA als Matrize unterbricht. [Voet et al. 1992]

Wie die Ergebnisse zeigen, unterscheiden sich die PBMC von Probanden und Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung hinsichtlich der untersuchten Prozesse nicht. Wir konnten ableiten, daß in ruhenden PBMC beider Gruppen die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase und Proteinsynthese die hauptsächlich energieverbrauchenden Prozesse sind. Aufgrund des geringen oder nicht bestimmbar bedarfs der einzelnen Verbraucher, ist es wahrscheinlich schwierig, anhand dieses Untersuchungsmodells Unterschiede zwischen den Probanden und Patientengruppen nachweisen zu können. Um eventuell vorhandene Reaktionen und Unterschiede besser verdeutlichen zu können, wurden die gleichen Untersuchungen in allen Gruppen nach mitogener Stimula-

tion vorgenommen. Zunächst stellt sich aber die Frage, welche Prozesse sich den restlichen, nicht in dieser Arbeit identifizierten Sauerstoffverbrauch verursachen?

Es ist anzunehmen, daß sich dieser Verbrauch einerseits durch den **ungekoppelten Sauerstoffverbrauch** und andererseits durch verschiedene **andere energieverbrauchende Prozesse** zusammensetzt. Neben dem gekoppelten Sauerstoffverbrauch, der fest an die ATP-Synthese gebunden ist, existiert der ungekoppelte Sauerstoffverbrauch. Dieser ist hauptsächlich vom Protonenleak verursacht und entspricht dem Protonenfluß im Mitochondrium, der unter Umgehung der ATP-Synthase erfolgt. Er trägt nicht zur ATP-Bildung bei. Ihm wird eine Bedeutung in der Wärmeproduktion, der Reduktion von schädlichen freien Radikalen und der Produktion von Redoxäquivalenten zugesprochen. [Rolfe et al. 1997] Für diesen ungekoppelte Sauerstoffverbrauch wurde in unserem Labor für ruhende PBMC ein prozentualer Anteil von 16,85% bestimmt [Schmid et al. 2000]. Der ungekoppelte Sauerstoffverbrauch wurde zwar nicht in dieser Arbeit bestimmt, sein Umfang kann jedoch abgeschätzt werden. In jedem Fall verbirgt er sich mit hinter dem nicht identifizierten Sauerstoffverbrauch.

Zu anderen intrazellulären ATP-verbrauchende Reaktionszyklen gehören beispielsweise die Phosphorylierung von Enzymen [Yakura et al. 1998; Goldbeter et al. 1987] oder der Umsatz von Membranphospholipiden [Berney et al. 1995]. Ein weiterer Teil des unbekannten Sauerstoffverbrauchs läßt sich im Rahmen der immunspezifischen Funktionen vermuten und suchen. Diese Aussage wird dadurch belegt, daß ruhende PBMC von Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung bzw. mit einer Infektion einen erhöhten Gesamtsauerstoffverbrauch hatten. So können Lymphozyten als Antwort auf entsprechende Signale in entzündete Gewebe auswandern [Janeway et al. 1997]. Diese Auswanderung wird durch lösliche Mediatoren gesteuert und durch den Grad der Aktivierung beeinflusst. Aktivierte T-Zellen wandern schneller als Ruhende. [Van Noort et al. 1998] Das Auswandern von Immunzellen aus der Blutbahn (Extravasation) zum Ort der Entzündung erfordert Energie [Bianchi et al. 1997]. Eine weitere beträchtliche Menge an ATP benötigen Lymphozyten für den Umbau ihres Zytoskeletts im Rahmen der Fortbewegung [Howard et al. 1997].

Lymphozyten benötigen Energie für Wachstum und Proliferation nach Aktivierung. Ein aktivierter Lymphozyt proliferiert, und durch eine klonale Expression entstehen spezifische Effektorlymphozyten. Die entstandenen Effektorzellen haben eine begrenzte Lebensdauer. Sie werden apoptotisch, wenn das Antigen nicht mehr vorhanden ist bzw. überleben und bilden die Grundlage des immunologischen Gedächtnisses [Janeway et al. 1997]. Zu den Effektorfunktionen zählen



die Synthese von Antikörpern, zellvermittelte Zytotoxizität und Regulationsfunktionen. Wahrscheinlich sind hier die Synthese von Antikörpern und Zytotoxizität die wichtigsten Energieverbraucher [Buttgereit et al. 2000]. Es gibt 3 funktionelle Klassen von T-Effektorzellen. Antigene, die von MHC-I-Molekülen präsentiert werden, werden von  $CD8^+$  Zellen erkannt, die zu zytotoxischen T-Zellen ausdifferenzieren. Antigene, die von MHC-II-Molekülen präsentiert werden, werden von  $CD4^+$  Zellen erkannt. Diese können sich dann in Th1 -Effektorzellen oder Th2 -Effektorzellen weiterentwickeln. Pathogene, die sich in großer Zahl in Vesikeln von Makrophagen ansammeln, induzieren gewöhnlich die Differenzierung von Th1-Zellen. Diese Zellen aktivieren die keimtötenden Eigenschaften von Makrophagen und regen B-Zellen zur Ig G-Antikörpersynthese an. Extrazelluläre Antigene stimulieren die Bildung von Th2-Zellen, die wiederum die Ig M-Antikörpersynthese stimulieren [Janeway et al. 1997].

#### 4.2.3 Therapeutische Glukokortikoidwirkungen auf den Gesamtsauerstoffverbrauch

Der Gesamtsauerstoffverbrauch von Patienten mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen wurde vor und nach Glukokortikoidtherapie untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, daß infolge der Glukokortikoidbehandlung der Gesamtsauerstoffverbrauch in PBMC der untersuchten Patienten abgenommen hat. Mit  $3,84 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  liegt er wieder in dem Bereich, den wir als physiologischen Verbrauch für die Probanden ermittelt haben. Ziele der Glukokortikoidbehandlung von Patienten mit Autoimmunerkrankungen sind eine Immunsupprimierung und „Eindämmung“ des überschießenden Entzündungsprozesses. Wir haben gefunden, daß der Gesamtsauerstoffverbrauch von PBMC mit zunehmender Aktivität der Erkrankung zunimmt. Nun zeigen unsere Ergebnisse, daß sich offenbar umgekehrt aus der Verlaufsbeobachtung des Gesamtsauerstoffverbrauchs auch eine Aussage über die therapiebedingte „Eindämmung“ der Aktivität und Verbesserung des klinischen Zustandes der Patienten ableiten läßt, indem der Gesamtsauerstoffverbrauch wieder abnimmt. Somit scheint sich der Glukokortikoideffekt in einer Abnahme des Gesamtsauerstoffverbrauchs gegenüber vor der Behandlung zu reflektieren.

Bekanntermaßen haben Glukokortikoide genomische und nicht-genomische Wirkungen, die den Zellmetabolismus beeinflussen [Buttgereit et al. 1998; Wehling et al. 1997]. Während genomische Effekte schon unter einer low-dose-Therapie auftreten, so werden nicht-genomisch spezifische Effekte bei mittleren und nicht-genomisch unspezifische Wirkungen erst bei hochdosierten Therapien beobachtet. Nach einer vier bis fünf tägigen mittelhoch bis hochdosierten Glukokorti-

koidbehandlung müßten alle genannten Wirkungen zum Tragen gekommen und ebenso schon daraus folgende Effekte aufgetreten sein. Welche Wirkungen könnten an dem wieder verminderten Gesamtsauerstoffverbrauch beteiligt bzw. ihn mit verursacht haben?

Über genomische Wirkungen wird zum einen die Transkription von Genen initiiert, der die Synthese von Proteinen, wie beispielsweise Lipocortin-1 folgt. Lipocortin-1 hemmt die Phospholipase A<sub>2</sub> und greift damit in die Arachidonsäurekaskade ein, wodurch die Synthese von Entzündungsmediatoren gehemmt wird [Goulding et al. 1993]. Zum anderen kommt es kernrezeptorvermittelt zur Hemmung der Synthese verschiedener proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-2 oder IL-6 [Buttgereit et al. 1995]. Diese Prozesse spielen eine Schlüsselrolle bei der „Eindämmung“ des Entzündungsprozesses und sind damit sicherlich von besonderer Bedeutung für das Ergebnis dieser Arbeit.

Da einige Patienten mit einer hoch dosierten Glukokortikoidtherapie behandelt wurden, sind bei diesen Patienten zusätzlich die nicht-genomischen unspezifisch physikochemischen Wirkungen zu diskutieren. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, daß hohe Dosen von Methylprednisolon praktisch sofort den Sauerstoffverbrauch hemmen. [Buttgereit et al. 1993] In Untersuchungen an Mitochondrien wurde nachgewiesen, daß hohe Dosen von Methylprednisolon Reaktionen auf Ebene der oxidativen Phosphorylierung inhibieren. Daraus resultiert eine verminderte ATP-Bereitstellung und sekundär eine verminderte Atmung [Buttgereit et al. 1994; Martens et al. 1991].

Hohe Dosen von Glukokortikoiden induzieren Apoptose in peripheren Lymphozyten von Patienten mit schweren Autoimmunerkrankungen [Migita et al. 1997]. Es ist unklar, ob dieser Effekt durch nicht-genomische oder genomische Prozesse ausgelöst wird. So werden genomische Effekte über eine Modulation der Expression verschiedener Gene vermittelt. In diesem Rahmen wird eine verminderte Aktivität des Transkriptionsfaktor AP-1 (FOS/JUN) diskutiert, welcher für das Überleben von Zellen nötig ist. Auf der anderen Seite gibt es Hinweise auf eine verstärkte Expression von Genen, welche an der Auslösung des programmierten Zelltodes beteiligt sind. So wurde in diesem Rahmen eine verstärkte Expression von Sequenzen nachgewiesen, die mit dem P2X<sub>1</sub> Rezeptor und einem IP<sub>3</sub> Rezeptor korrespondieren [Buttgereit et al. 2000; Distelhorst et al. 1998].

Bei Apoptose, ausgelöst durch Glukokortikoide oder andere Vermittler, ist das mitochondriale Membranpotential erniedrigt [Kroemer et al. 1997], woraus wiederum eine verminderte ATP-Verfügbarkeit resultiert [Petit et al. 1995]. Die angeführten Aspekte zeigen die Komplexität und

Interferenz der Wirkungen von Glukokortikoiden auf humane PBMC. Alle die zuvor genannten und durch Glukokortikoide hervorgerufenen Prozesse können entweder zu einer direkten Hemmung der Atmung oder zu einer verminderten ATP-Verfügbarkeit führen. Der verminderte Gesamtsauerstoffverbrauch der PBMC von Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung nach Glukokortikoidtherapie steht damit im Einklang zu diesen Erkenntnissen. Prinzipiell führen alle diskutierten Mechanismen letztendlich zu einer verminderten Aktivität von Immunzellen, was sich vier bis fünf Tage nach Einleitung der Glukokortikoidtherapie in einer wieder reduzierten und normalisierten Atmung widerspiegelt.

#### 4.2.4 Therapeutische Glukokortikoidwirkungen auf hauptenergieverbrauchende Prozesse

Die PBMC der Gruppe von Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung wurden unter ruhenden Bedingungen nicht bilanziert, da nicht genügend Material zur Verfügung stand. Daher kann keine Aussage zum Umfang bzw. zur Änderung des Umfangs der einzelnen ATP-verbrauchenden Prozesse getroffen werden. Orientierende Untersuchungen haben gezeigt, daß es sich prinzipiell um dieselben Energieverbraucher handelt, die im Kapitel 4.2.2 beschrieben wurden. Die Ergebnisse blieben ohne richtungsweisende Hinweise auf eindeutige Veränderungen.

### **4.3 Energiestoffwechsel in stimulierten PBMC**

#### **4.3.1 Stimulierbarkeit ruhender PBMC**

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß die PBMC von gesunden Probanden und PBMC von Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung sich in der Stimulierbarkeit nicht unterscheiden. PBMC von Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung hatten die geringste und im Gegensatz dazu PBMC von Patienten mit einer aktiven Infektion vor Therapiebeginn die höchste Stimulierbarkeit aller Gruppen.

Damit gelang es anhand dieser Arbeit erstmalig darzulegen, daß sich die Stimulierbarkeit der PBMC in Abhängigkeit von der klinisch und laborchemisch eingeschätzten Aktivität entzündlich-rheumatischer Erkrankungen verändert. Zweitens konnten wir interessanterweise feststellen, daß sich aktivierte PBMC von Patienten mit einer entzündlich-rheumatischen Erkrankung bzw. Infektion hinsichtlich der Stimulierbarkeit unterscheiden.

Con A wurde als definierter Stimulus eingesetzt und führte erwartungsgemäß in allen Gruppen zum Anstieg des Sauerstoffverbrauchs und damit zur Zellaktivierung. Es ist seit langem bekannt, daß die Inkubation von Lymphozyten mit Mitogenen zu einem Anstieg des Sauerstoffverbrauchs führt [Lakin-Thomas et al. 1988; Buttgereit et al. 1992; Guppy et al. 1993]. Das Lektin Con A ist ein Mitogen, das vornehmlich T-Lymphozyten stimuliert [Krauss et al. 1999]. Es bindet an eine Untereinheit des T-Zell-Rezeptors (TCR) [Chilson et al. 1989] und triggert über eine Vernetzung der TCR die intrazelluläre Signalkaskade. Im Ergebnis der Signaltransduktion kommt es zu einem Anstieg der Konzentrationen der sekundären Botenstoffe  $\text{Ca}^{2+}$ , Inositoltriphosphat und Diacylglycerol. Diese Signale führen zur Synthese zahlreicher, verschiedener Proteine und münden in einer Aktivierung und Proliferation der Zellen. So kommt es beispielsweise zur Produktion von IL-2 und zur Expression des IL-2 Rezeptors [Grinstein et al. 1989]. Die Stimulierung durch Con A erfolgt im Gegensatz zur autoreaktiven Stimulation polyklonal und unspezifisch vom TCR. Damit führt sie nicht zu einem Aktivitätszustand, der dem von PBMC rheumatisch erkrankter Patienten entspricht. Die mitogene Stimulation mit Con A ist für unsere Untersuchungen von Vorteil, da mit ihr eine große Anzahl der Lymphozyten von der Stimulation erfaßt und entsprechende Folgereaktionen deutlicher hervorgehoben werden. Wie Experimente an Rattenthymozyten zeigen, lassen sich in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen bis zu 80% der isolierten Thymozyten innerhalb von Sekunden mit Con A stimulieren. [Krauss et al. 1999; Buttgereit et al. 1993]

PBMC von gesunden Probanden konnten ihren Sauerstoffverbrauch um  $2,03 \pm 0,1$  nmol  $O_2$ /min/ $10^7$  Zellen erhöhen. Diese Stimulation steht damit unter den standardisierten experimentellen Bedingungen für einen Referenzbereich, der Normalbedingungen präsentiert. Mit Con A können nun vergleichend unterschiedliche Reaktionsweisen und damit Zustände des Energiemetabolismus der Gruppen aufgedeckt werden. Als nächstes wurde festgestellt, daß sich der Sauerstoffverbrauch der PBMC von Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung um  $2,15 \pm 0,28$  nmol  $O_2$ /min/ $10^7$  Zellen stimulieren ließ. Damit unterscheidet er sich nichtsignifikant zu dem Wert, der für Normalbedingungen steht. Man kann also sagen, daß die PBMC beider Gruppen ihren Sauerstoffbedarf unter polyklonaler Stimulation mit Con A im gleichem Umfang erhöhen konnten. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß PBMC einer inaktiven oder ruhenden entzündlich-rheumatische Erkrankung normal stimulierbar sind. Im Gegensatz dazu sind PBMC von Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung nur noch um  $1,51 \pm 0,33$  nmol  $O_2$ /min/ $10^7$  Zellen stimulierbar. Das ist deutlich weniger als normal. Die Patienten haben offenbar bedingt durch die Erkrankung ein schon voraktiviertes Immunsystem, was aus dem erhöhten Gesamtsauerstoffverbrauch der PBMC geschlossen werden konnte. Nun wurden die PBMC dieser Patienten zusätzlich mit Con A stimuliert. Das heißt, sie wurden noch einem zusätzlichen polyklonalen unspezifischen Stimulus unterworfen, um ihre verbliebene Reagibilität zu testen. Vermutlich konnten die PBMC aufgrund der erkrankungsbedingten starken antigenen Vorstimulation und Erschöpfung nun nicht mehr in gleicher Weise auf einen definierten Stimulus wie PBMC von Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung und Probanden reagieren.

Die PBMC von Patienten mit einer akuten Infektion zeigten dagegen eine Stimulierbarkeit von  $2,9 \pm 0,49$  nmol  $O_2$ /min/ $10^7$  Zellen. Damit nahm hier die Stimulierbarkeit gegenüber Normalbedingungen deutlich zu, während sie bei PBMC von Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung abnahm. Beide Gruppen verhalten sich damit gegensätzlich bezüglich der Stimulierbarkeit.

Die nur orientierend untersuchte Kontrollgruppe der Patienten mit einer akuten Infektion vor Therapiebeginn bestand nur aus fünf Patienten. Dennoch zeigen die Ergebnisse deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Der Hauptbefund besteht darin, daß die PBMC der Gruppe der Patienten mit einer akuten Infektion schon den höchsten Gesamtsauerstoffverbrauch aller Gruppen hatten und sich nun noch zusätzlich sehr stark mit Con A stimulieren ließen. Dieses Ergebnis wird noch eindrücklicher sichtbar, wenn man sich den Sauerstoffverbrauch nach Con

A-Stimulation vergegenwärtigt. Somit hatten PBMC von Probanden nach Con A-Stimulation einen durchschnittlichen Sauerstoffverbrauch von  $5,87 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7$  Zellen, PBMC von Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung einen von  $6,33 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7$  Zellen und PBMC von Patienten mit einer Infektion einen von  $8 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7$  Zellen. Damit wird gezeigt, daß die PBMC ihren Sauerstoffverbrauch grundsätzlich bis auf  $8 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7$  Zellen und mehr steigern können und die Gruppen unterschiedlich aktivierbar sind.

Die Ursache des unterschiedlichen Verhaltens hinsichtlich der Stimulierbarkeit der Gruppen mit einem entzündlich-rheumatisch bzw. durch eine Infektion aktivierten Immunsystem ist unklar. Zur Klärung müssen weitere Untersuchungen vorgenommen werden. Eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Verhalten könnte die folgende sein: Patienten mit der Infektion hatten vor Ansteckung ein intaktes und nicht chronisch aktiviertes Immunsystem. Die PBMC arbeiteten daher vermutlich nicht an der „Grenze ihrer Möglichkeiten“, wie die der Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung. Sie konnten sich deshalb wahrscheinlich besser auf den Con A-Stimulus einstellen und ihren Sauerstoffverbrauch den Einflüssen adäquat anpassen. Somit würde man mit der Stimulierbarkeit eine Aussage zur verbleibenden Fähigkeit der PBMC treffen, auf einen antigenen Stimulus zu reagieren. Chronisch bzw. lange stark aktivierte PBMC könnten durch eine verminderte Stimulierbarkeit und akut sowie noch nicht so lange aktivierte PBMC durch eine normal / erhöhte Stimulierbarkeit gekennzeichnet sein. Es besteht aber genauso die Möglichkeit, daß es sich um unterschiedliche Reaktionsweisen beider genannter Gruppen handelt. In diesen Fall könnte die Stimulierbarkeit möglicherweise für die Diagnostik von Relevanz sein. Oft ist es bei entzündlich-rheumatisch Erkrankten schwierig zu unterscheiden, ob neu aufgetretene Beschwerden durch Krankheitsaktivität, degenerative Veränderungen oder eine Infektion verursacht sind.

#### 4.3.2 Hauptenergieverbrauchende Prozesse

Im nächsten Schritt wurde versucht zu klären, wie sich die hauptenergieverbrauchenden Prozesse unter mitogen-stimulierten Bedingungen bei PBMC von entzündlich – rheumatisch erkrankten Patienten verhalten. Das heißt, es wurde wieder der Verbrauch durch die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase, Proteinsynthese,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und DNA/RNA-Synthese auf den Sauerstoffverbrauch, diesmal jedoch nach Zugabe von Con A aufschlüsselnd ermittelt.

Die Ergebnisse haben gezeigt, daß der Verbrauch durch die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase mitogen-stimulierter PBMC innerhalb der Gruppen unterschiedlich groß ist. Den größten Verbrauch hatten PBMC der Gruppe der Probanden. Dieser nahm in der Gruppe der PBMC von Patienten mit einer inaktiven gefolgt von denen mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung vor Therapie ab. Die Daten sind in der Abbildung 17 dargestellt.

Sauerstoffverbrauch ( $\text{nmol} / \text{O}_2 / \text{min} / 10^7$  Zellen)

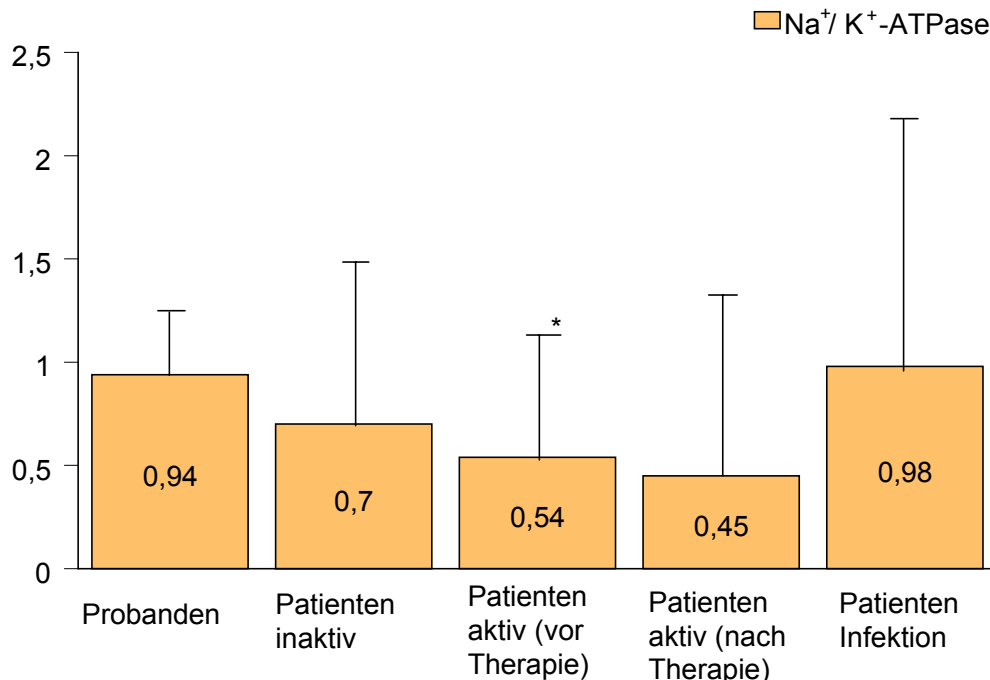


Abbildung 17: Sauerstoffverbrauch der  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase im Vergleich zwischen den Gruppen. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung. \*signifikant unterschiedlich zur Gruppe der Probanden ( $p=0,007$ )

Der absolute und prozentuale Bedarf der  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase nimmt unter mitogener Stimulation zu [Schmid et al. 2000; Buttgerit et al. 1992]. Damit sind die Ergebnisse dieser Arbeit im Einklang mit früheren Untersuchungen. Die Gruppe der Probanden und Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung wurde unter ruhenden und stimulierten Bedingungen vollständig in ihrem ATP-Verbrauch quantifiziert. Die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase ruhender PBMC von Probanden und Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung hatte einen Verbrauch von  $0,25 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  (6,7%) bzw.  $0,33 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  (7,7%). Nach Stimulation lag er bei  $0,94 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  (16%) bzw.  $0,7 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  (11%). In unserem experimentellen Modell betrachten wir den Wert der für die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase unter Stimulation bei Probanden ermittelt wurde, als eine Art Referenzbereich und Normalverbrauch. Nach mitogener Stimulation kommt es zu Verschiebungen der zellulären Konzentrationen von  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Cl}^-$  sowie anderer Ionen. Außerdem existieren in Lymphozyten ladungsabhängige Natriumkanäle. [Gallin et al. 1991; Seligmann et al. 1990] Nach mitogener Stimulation wird in zahlreichen Studien ein erhöhter Natriumfluß über die Zellmembran entlang des chemischen Gradienten beschrieben, so daß getriggert durch einen Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration die Aktivität der  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase zunimmt. Es ist eine zwei bis dreifach erhöhte Umsatzrate der  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase beschrieben worden, die etwa für drei Stunden anhält und von einer erhöhten Anzahl (Expression) der  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase-Moleküle in der Membran gefolgt wird [Buttgerit et al. 2000; Seligmann et al. 1990].

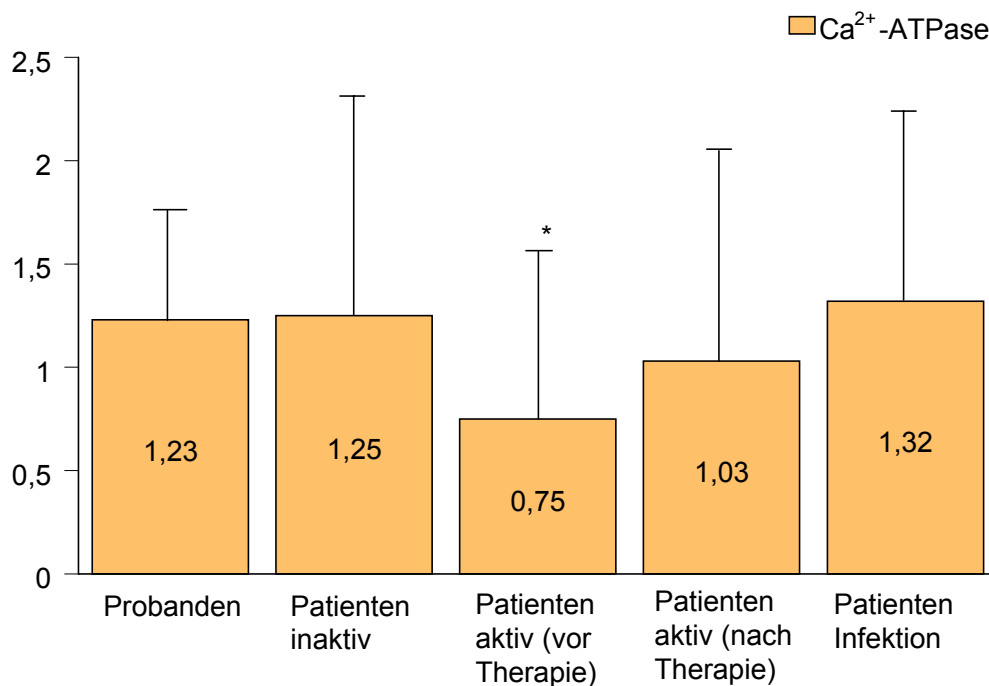
Neu war jedoch die Entdeckung, daß der Verbrauch an Energie durch die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase bei mitogen-stimulierten PBMC mit zunehmender Krankheitsaktivität tendenziell abnahm. So wurde durch sie bei der Gruppe der Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung nur noch  $0,7 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  (11%) verstoffwechselt und bei Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung nur noch  $0,54 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  (8,5%). Obwohl ihre Funktion zelleigenen wie auch immunspezifischen Funktionen zugute kommt, scheint die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase in ihrer Aufgabe restringiert. Die Ursache dafür ist jedoch noch unklar. Möglicherweise benötigen andere Prozesse höherer Priorität die Energie unter diesen Bedingungen, so daß die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase sekundär herabgeregelt wird. Denkbar ist aber auch eine direkte Verminderung der  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase-Aktivität durch die Aktivität der Erkrankung.

Bei PBMC der Patienten mit einer Infektion war der absolute Verbrauch mit  $0,97 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  (12,1%) in etwa dem der Probanden. Allerdings fiel eine außerordentlich hohe Streuung zwischen diesen Werten auf. Um hier eine genauere Aussage treffen zu können, müssen noch weitere Untersuchungen folgen.



Ähnliches kann für den Verbrauch der **Ca<sup>2+</sup>-ATPase** berichtet werden. Die Ergebnisse zeigten, daß sich auch der Verbrauch der Ca<sup>2+</sup>-ATPase in PBMC der Gruppen ändert. Der Verbrauch ist bei der Gruppe der Probanden und Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung in etwa gleich und am größten. Bei PBMC von Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung nimmt er ab. Die Daten sind in der Abbildung 18 dargestellt.

Sauerstoffverbrauch (nmol / O<sub>2</sub> / min / 10<sup>7</sup> Zellen)



**Abbildung 18:** Sauerstoffverbrauch der Ca<sup>2+</sup>-ATPase im Vergleich zwischen den Gruppen. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung. \*signifikant unterschiedlich zur Gruppe der Probanden (p=0,032)

Während in ruhenden Zellen kein signifikanter Verbrauch durch die Ca<sup>2+</sup>-ATPase nachgewiesen werden konnte, so war er nach mitogener Stimulation grundsätzlich vorhanden und in den einzelnen Gruppen unterschiedlich stark meßbar. Die Ca<sup>2+</sup>-ATPase hatte in humanen PBMC von gesunden Probanden einen anteiligen Verbrauch von 1,23 nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen (21%) am Gesamtsauerstoffverbrauch. Unter mitogener Stimulation kommt es zu einer Zunahme des Energieverbrauchs durch die ATP-abhängige Ca<sup>2+</sup>-ATPase. Dieser erhöhte Sauerstoffverbrauch der Ca<sup>2+</sup>-ATPase nach mitogener Stimulation ist in der Vergangenheit mehrfach durch Arbeiten an Lymphozyten belegt und wurde hier erstmals für Patienten bestätigt. [Schmid et al. 2000; Buttgeriet et al. 1992] Es ist bekannt, daß Con A in Lymphozyten zu einem anhaltenden Anstieg der

intrazellulären Calciumkonzentrationen führt und damit unmittelbar eine erhöhte Pumpaktivität der ATPase nach sich zieht [Lewis et al. 1995].  $\text{Ca}^{2+}$  wirkt als universaler second messenger, und der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist das essentielle Signal zum Anstoß vieler Effektorreaktionen. Aufgrund dieser Funktion dient der hohe Energieverbrauch der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase nach mitogener Stimulation der Wiederherstellung des Ionengradientens.

Wir können auch für die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase mit zunehmender Krankheitsaktivität einen tendenziell abnehmenden Sauerstoffverbrauch in stimulierten PBMC berichten. So betrug er bei PBMC von Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung 1,25 nmol  $\text{O}_2$ /min/ $10^7$  Zellen (19,8%) am Gesamtsauerstoffverbrauch und bei Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung nur noch 0,75 nmol  $\text{O}_2$ /min/ $10^7$  Zellen (11,8%). Auch hier ist die Ursache noch unklar. Bei PBMC der Patienten mit einer Infektion war der Verbrauch mit 1,32 nmol  $\text{O}_2$ /min/ $10^7$  Zellen (16,5%) in etwa wie bei Probanden. Da eine recht hohe Streuung zwischen den einzelnen Werten auffällt, ist die Aussagekraft der Daten begrenzt.

In den Untersuchungen zum Verbrauch der **Proteinsynthese** in mitogen-stimulierten PBMC, wurde festgestellt, daß der Bedarf der Proteinsynthese in allen Gruppen durch Con A-Stimulation absolut und prozentual zunahm. Der Verbrauch ist in PBMC der Gruppe der Probanden und Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung in etwa gleich und nimmt bei PBMC von Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung ab. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 19 dargestellt.

Sauerstoffverbrauch (nmol / O<sub>2</sub> / min / 10<sup>7</sup> Zellen)

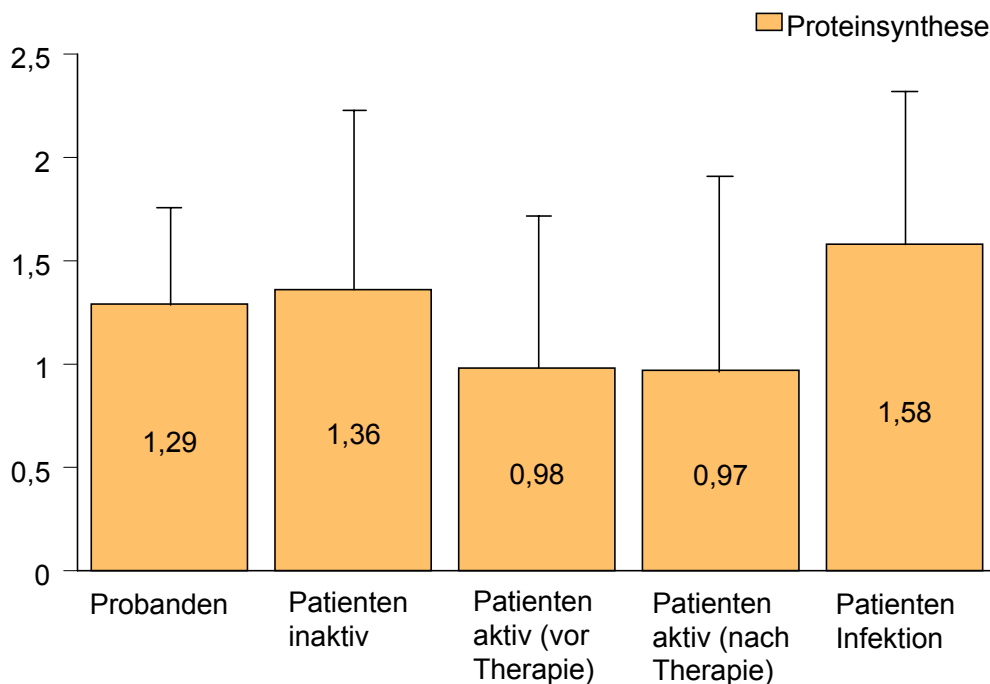
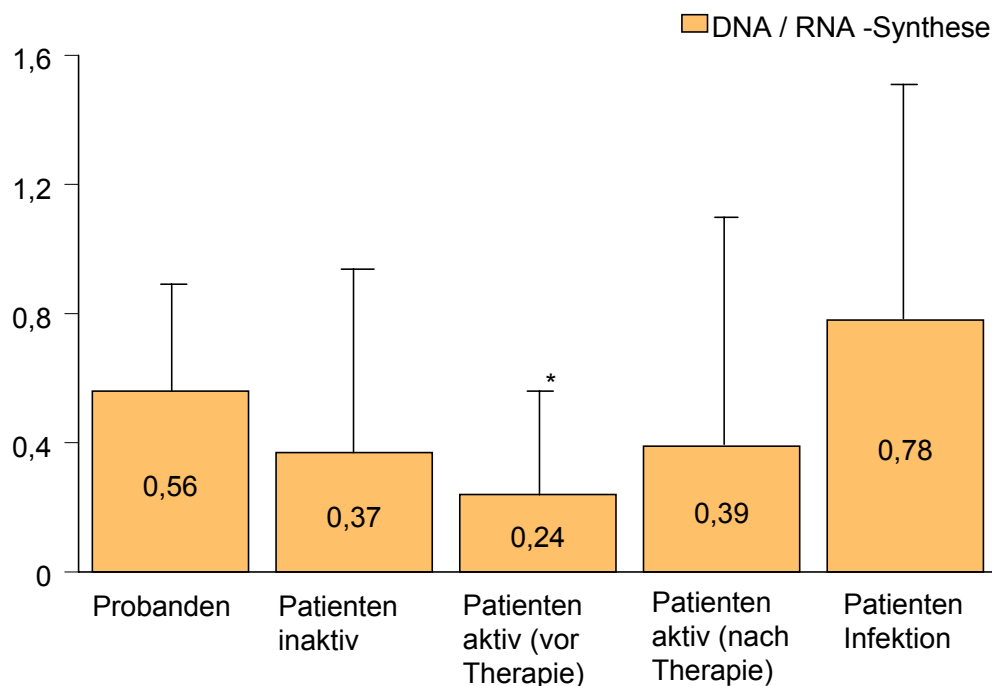


Abbildung 19: Sauerstoffverbrauch der Proteinsynthese im Vergleich zwischen den Gruppen. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede.

Für die **DNA/RNA-Synthese** war im Gegensatz zu ruhenden Bedingungen nur nach mitogener Stimulation ein signifikanter Sauerstoffverbrauch meßbar. Dieser war bei PBMC von Probanden am größten und nahm in der Gruppe der Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung ab. In PBMC der Gruppe der aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung war der Verbrauch am geringsten. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 20 dargestellt.

Sauerstoffverbrauch (nmol / O<sub>2</sub> / min / 10<sup>7</sup> Zellen)



**Abbildung 20:** Sauerstoffverbrauch der DNA/RNA-Synthese im Vergleich zwischen den Gruppen. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung. \*signifikant unterschiedlich zur Gruppe der Probanden (p=0,011)

Damit verhalten sich humane PBMC von Patienten prinzipiell ähnlich, wie wir es aus früheren Experimente an stimulierten Rattenthymozyten und humanen PBMC aus Buffy coats kennen. [Schmid et al. 2000; Buttgereit et al. 1992] Aus diesen Experimenten ist bekannt, daß innerhalb von wenigen Minuten in stimulierten Rattenthymozyten und humanen PBMC von Buffy coats der Sauerstoffverbrauch durch die Proteinsynthese und DNA/RNA-Synthese in Abhängigkeit von der Stimulierung zunimmt. So hatten die Proteinsynthese und DNA/RNA-Synthese in humanen PBMC von Buffy coats unter optimaler Stimulation einen prozentualen Anteil von 14% und 8% am Gesamtsauerstoffverbrauch. In dieser Arbeit wurde er bei Probanden für die Proteinsynthese mit 1,29 nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen (22%) und für die DNA/RNA-Synthese mit 0,56 nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen (9,5%) bestimmt. Prinzipiell handelt es sich um gleichsinnige Veränderungen des Verbrauchs durch die Proteinsynthese und DNA/RNA-Synthese in den Gruppen, wie bei der Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase und Ca<sup>2+</sup>-ATPase.

Untersuchungen von Lijnen et al. an PBMC, die auf dem Einbau radioaktiv markierter Isotope beruhen, bekräftigen die Zunahme neu gebildeter DNA, RNA und Proteine nach Inkubation mit Con A. [Lijnen et al. 1997] Die Stimulierung mit Con A führt zu einer Differenzierung und Proliferation der Lymphozyten. Über die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren kommt

es zur Synthese und Sekretion zahlreicher Proteine, wie beispielsweise den Faktoren Interleukin-2 und -4 oder den inflammatorisch wirkenden Zytokinen Interleukin-1, -6, -8 und Tumornekrose-Faktor. Infolge des Übertritts der Zellen aus der G<sub>0</sub>-Phase in die S-Phase des Zellteilungszyklus wird eine Neusynthese und Verdopplung der zellulären DNA induziert. Diese beschriebenen Effekte treten jedoch später auf als in unseren Experimenten. Daher vermuten wir einen sofortigen ATP-Verbrauch für vorangehende Prozesse, die direkt in die oben genannten einmünden. Dazu gehört zum Beispiel der Transport von Aminosäuren über Plasmamembranen. [Buttgereit et al. 2000]

Tendenziell konnte damit bei allen hauptenergieverbrauchenden Prozessen festgestellt werden, daß der absolute und (oder) prozentuale Bedarf durch die einzelnen Prozesse in Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität entzündlich-rheumatischer Erkrankungen abnahm.

Wenn man die einzelnen Prozesse für jede Gruppe zusammenfaßt, sieht man, daß die typischen zelleigenen ATP-Verbraucher unter Stimulation bei Probanden etwa 4,02 nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen (68,5%) der Energie verbrauchen. Dies entspricht unter unseren experimentellen Bedingungen einem Normwert. Das heißt, daß normalerweise die zelleigenen ATP-Verbraucher fast 70% der Energie verstoffwechseln. 30% des Sauerstoffverbrauchs stehen unter diesen Bedingungen dem ungekoppelten Sauerstoffverbrauch und „anderen Prozessen“ zur Verfügung. Bei Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung werden durch die untersuchten ATP-Verbraucher 3,68 nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen (58,1%) und bei einer aktiven Erkrankung vor Therapie nur noch 2,51 nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen (39,7%) der Energie verstoffwechselt.

Unter Berücksichtigung des ungekoppelten Sauerstoffverbrauchs, der in unseren Labor für mitogen-stimulierte humane PBMC aus Buffy coats mit 10,75% bestimmt wurde, liegt die entscheidende Beobachtung in der Zunahme des Verbrauchs durch **andere Prozesse**. Während der Probandengruppe unter mitogener Stimulation ca. 1,22 nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen (20,8%) nicht zugeordnet werden konnte, so waren es in der Gruppe der Patienten mit einer inaktiven rheumatischen Erkrankung 1,97 nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen (31,1%) und in der Gruppe der aktiv rheumatisch Erkrankten 3,14 nmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>7</sup> Zellen (49,6%). Es läßt sich anhand des Modells der bioenergetischen Bilanzierung von humanen PBMC schlußfolgern, daß für Krankheitsaktivität der Anstieg des Energieverbrauchs für die anderen ATP-verbrauchenden Prozesse kennzeichnend ist.

Welche Prozesse verbergen sich hinter diesen „Anderen“? Die Ergebnisse der Patienten mit einem aktivierten Immunsystem spiegeln sicher den Tatbestand wider, daß die durch Autoimmun-

prozesse aktivierten PBMC neben ihren generellen Funktionen in Abhängigkeit von ihrer Krankheitsaktivität einen zunehmenden Energieverbrauch für ihre überschießenden immunspezifischen Funktionen haben, da der Verbrauch der anderen Prozesse mit zunehmender Krankheitsaktivität zunahm. Im Zusammenhang damit fiel eine in Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität verminderte Stimulierbarkeit auf. Wir interpretierten dies als bereits in Anspruch genommene Ausschöpfung von Stoffwechselleistungsreserven. Im Kontext mit diesen Beobachtungen zeigte sich desweiteren, daß die typischen zelleigenen ATP-Verbraucher deutlich weniger verstoffwechseln als gewohnt. Das legt die Vermutung nahe, daß diese Prozesse supprimiert ablaufen oder sogar für einen erhöhten Bedarf anderer eingeschränkt worden sind. Bei diesen anderen Prozessen handelt es sich am ehesten um die, welche wir schon für die ruhenden PBMC diskutiert haben. Desweiteren liegt es bedingt durch die Krankheitsaktivität nahe, daß immunspezifischen Funktionen einen Mehrbedarf in Anspruch nehmen. Zu diesen gehören beispielsweise Migration, Aktivierungsprozesse, aber auch Effektorfunktionen, wie Antikörpersynthese, Zytotoxizität und andere Regulationsfunktionen [Buttgereit et al. 2000; Hatz et al. 1998].

#### 4.3.3 Therapeutische Glukokortikoidwirkungen auf den Gesamtsauerstoffverbrauch

Die Patienten mit einer aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung wurden mit Glukokortikoiden behandelt. Durch den Vergleich der Ergebnisse vor und nach Therapie konnten zwei wesentliche Effekte der Glukokortikoidtherapie herausgearbeitet werden. Wir haben mit  $3,84 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  wieder eine Normalisierung des Gesamtsauerstoffverbrauchs und mit  $1,82 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  eine teilweise wieder hergestellte Stimulierbarkeit verglichen mit dem Status Behandlungsbeginn nachgewiesen. Es wurde bereits diskutiert, daß nach einer vier bis fünf täglichen Behandlungsdauer alle genannten Wirkungen der Glukokortikoide zum Tragen gekommen und ebenso schon daraus folgende Effekte eingetreten sein müssen. Durch den damit systemisch „eingedämmten“ Entzündungsprozeß hat sich der Stoffwechsel der PBMC wahrscheinlich wieder normalisiert und dem eines nicht antigen-aktivierten angenähert. Glukokortikoide entfalten ihre Wirkungen schließlich nicht nur in Lymphozyten, sondern auch auf Fibroblasten in den vom Entzündungsprozeß betroffenen Geweben, auf Endothelzellen und andere Gruppen von Leukozyten. [Buttgereit et al. 1995]

#### 4.3.4 Therapeutische Glukokortikoidwirkungen auf hauptenergieverbrauchende Prozesse

Der Effekt der Glukokortikoidbehandlung der Patienten auf die einzelnen sauerstoffverbrauchenden Prozesse war verschieden. Die Ergebnisse sind vergleichend zum Verbrauch vor der Behandlung in den Abbildungen 17-20 dargestellt.

Der Verbrauch durch die  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$  hat mit  $0,45 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  (8%) weiter abgenommen. Im Gegensatz dazu nahm er bei der  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$  mit  $1,03 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  (18,2%) wieder zu. Der Verbrauch durch die Proteinsynthese veränderte sich mit  $0,97 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  (17,1%) gegenüber vor Behandlung nicht. Im Gegensatz dazu nahm er bei der DNA/RNA-Synthese mit  $0,39 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  (6,9%) ebenfalls wieder zu.

Das verschiedene Verhalten der Prozesse unter Therapie ist unklar. Die beschriebenen Effekte sind jedoch ohne signifikanten Unterschied zu den Werten vor Therapie. Desweiteren fiel eine hohe Streuung zwischen den Werten auf. Diese hohe Streuung ist wahrscheinlich Ausdruck der unterschiedlichen klinischen Symptomatik der Patienten. Als wesentlich ist jedoch herauszustellen, daß alle vier Prozesse zusammen einen Verbrauch  $2,84 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  (50,2%) hatten. Damit hat dieser absolut und prozentual wieder zugenommen und sich den Werten der Probanden etwas angenähert.  $2,82 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  (49,8%) des Sauerstoffverbrauchs sind nicht den Haupt-ATP-Verbrauchern zuzuschreiben und wurden durch den ungekoppelten Sauerstoffverbrauch und vermutlich durch die schon diskutierten anderen Prozesse verstoffwechselt. Nach rechnerischer Berücksichtigung des ungekoppelten Sauerstoffverbrauchs würde sich für die anderen ATP-verbrauchenden Prozesse ein Bedarf von etwa  $2,21 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7 \text{ Zellen}$  (39,0%) ermitteln lassen. Der reduzierte Verbrauch dieser anderen Prozesse reflektiert mit größter Wahrscheinlichkeit die klinische Besserung und Eindämmung des systemischen Entzündungsprozesses.

#### **4.4 *In vitro* - Glukokortikoideffekte auf die PDE - Expression**

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß nach einer vier bis fünf täglichen Glukokortikoidbehandlung der Patienten, sich der PBMC-Sauerstoffverbrauch wieder dem der Probanden angeglichen hat. Gleichzeitig nahm die Stimulierbarkeit wieder zu. Wir haben diese Ergebnisse als Eindämmung des Entzündungsprozesses infolge der Therapie betrachtet und erörtert.

Neben den beschriebenen Wirkungen über genomische und physikochemische Mechanismen, werden seit längerem ein Eingreifen der Glukokortikoide in die Signaltransduktion diskutiert. [Yingling et al. 94; Thoresen et al. 1989; Elks et al. 1984 Untersuchungen der Arbeitsgruppe Wertenauer [2000] und Parker [1973], zeigten, daß die Inkubation mit Glukokortikoiden in ruhenden und mitogen stimulierten Zellen innerhalb von Minuten zur Akkumulation von cAMP führen.

Intrazelluläres cAMP ist ein bedeutender Regulator der lymphozytären Aktivität und spielt damit eine Schlüsselrolle im Ablauf von Entzündungsprozessen. [Ekholm et al. 1999] Die Beeinflussung des cAMP kann sowohl durch die cAMP bildende Adenylatzyklase als auch durch die cAMP abbauende cAMP-spezifischen PDE erfolgen. In der Vergangenheit konnte für verschiedene cAMP-erhöhende Substanzen und (oder) Medikamente eine inhibitorische Wirkung auf die Lymphozytenproliferation gezeigt werden. [Banner et al. 1999; Marcoz et al. 1993] Dies geschah beispielsweise für Prostaglandine, einem indirekten Aktivator, und für Forskolin, einem direkten Aktivator der Adenylatzyklase [Banner et al. 1999].

Es gibt seit längeren Hinweise darauf, daß Glukokortikoide zu einer verminderten Aktivität der cAMP abbauenden cAMP-spezifischen PDE führen. [Christoffersen et al. 1984; Elks et al. 1984, Yingling, Thoresen] Jedoch ist es unklar, ob es sich dabei um ein direktes Eingreifen handelt oder ob es über verschiedene interferierende Prozesse dazu kommt.

Wertenauer et al. [2000] nehmen an, daß sich die Glukokortikoide in höherer Konzentration in zelluläre Membranen einlagern (interkalieren) bzw. vermittelt durch membranständige Rezeptoren, sofort einsetzende Effekte auslösen, die in die Signaltransduktion eingreifen. Ein erhöhtes cAMP kann seinerseits die TCR-getriggerte Signalkaskade beeinflussen. [Ekholm et al. 1999; Eyster et al. 1998; Tamir et al. 1996; Conti et al. 1995, Skalhegg et al. 1994] Die Akkumulation des cAMP kann sowohl durch eine erhöhte Aktivität der cAMP bildenden Adenylatzyklase [Buc et al. 1993], als auch durch eine verminderte Aktivität der cAMP abbauenden cAMP-spezifischen PDE verursacht sein [El Bawab et al. 1997; Conti et al. 1995]. Wertenauer et al. [2000] vermuten aber, daß dieser Effekt durch die hemmende Wirkung der Glukokortikoide auf



die cAMP-spezifische Phosphodiesterase verursacht wird. Dieser Glukokortikoideffekt müßte allerdings nicht-genomisch sein, da er innerhalb weniger Minuten auftritt, so daß die Einbeziehung des Genoms nicht möglich ist.

Daher haben wir über einen Inkubationszeitraum von 120 Minuten für PBMC ohne und mit Prednyliden bzw. Dexamethason die Expression der cAMP-spezifischen PDE untersucht. Dabei konnten wir bisher keine Veränderungen zwischen der Expression ohne und mit Glukokortikoidinkubation nachweisen. Desweiteren waren auch keine Veränderungen im Zeitverlauf, das heißt bei Inkubationszeiten von 5, 30, 60, 90 und 120 min für Prednyliden zu finden. Das selbe traf für Dexamethason für 5, 60 und 120 min zu. Dagegen wurde vor kurzem durch Hermsdorf et al. [1999] an Rattenhepatozyten durch Dexamethason eine verminderte PDE-Aktivität nachgewiesen. Diese trat sofort nach Inkubation und bei einer geringeren Dexamethasonkonzentration auf. Damit korreliert der dort beschriebene Effekt mit dem Zeitraum, in welchem Wertenaue et al. [2000] eine erhöhte cAMP-Konzentration, allerdings in humanen PBMC, nach Glukokortikoidapplikation messen konnte.

Somit lassen sich für humane PBMC und für die in dieser Arbeit untersuchten Konzentrationen sowie Inkubationszeiten keine Effekt auf die cAMP-spezifischen PDE nachweisen. Zur weiteren Klärung des Eingreifens der Glukokortikoide in die TCR-vermittelte Signalkette via Erhöhung der cAMP-Konzentration müssen weitere Untersuchungen folgen.

## **5 Klinische Relevanz der Ergebnisse**

Die Ergebnisse zeigen, daß sich die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Parameter in Abhängigkeit der Aktivität entzündlich-rheumatischer Erkrankungen ändern.

Der Sauerstoffverbrauch aus Vollblut präparierter PBMC von Patienten mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen und Infektionen korreliert direkt mit der Krankheitsaktivität. Er erhöht sich mit zunehmender Krankheitsaktivität.

Desweiteren korreliert die Stimulierbarkeit invers mit der Krankheitsaktivität entzündlich-rheumatischen Erkrankungen. Sie nimmt mit zunehmender Krankheitsaktivität ab.

Der Anteil der „anderen“ ATP-verbrauchenden Prozesse nimmt bei aktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankungen zu und der Anteil der untersuchten Hauptenergieverbraucher ab.

Da sich der Gesamtsauerstoffverbrauch, die Stimulierbarkeit und die ATP-verbrauchenden Prozesse in charakteristischer Weise mit der Krankheitsaktivität entzündlich-rheumatischer Erkrankungen verändern, könnten diese Parameter in der klinischen Diagnostik von Bedeutung werden. Eine perspektivische Bedeutung zur Einschätzung der Krankheitsaktivität ist wahrscheinlich. Besonders hilfreich sollten derartige Untersuchungen sein, wenn es bei Patienten um die Differenzierung zwischen entzündlich-rheumatischen und degenerativen Gelenkbeschwerden geht, oder aber wenn die schwierige Differentialdiagnose zwischen Infektion oder Schub der Grunderkrankung zu diskutieren ist. Vor allem aber könnten sie von großem Interesse zur Beobachtung des Ansprechens eines Patienten auf eine Glukokortikoidtherapie und deren Erfolg werden. Auf jeden Fall eröffnen sich mit diesen Erkenntnissen neue Möglichkeiten zur Einschätzung der Aktivität des Immunsystems. Prospektiv sollten ergänzende Untersuchungen und eine weitere Optimierung unserer Untersuchungsmethode erfolgen.

## **6 Zusammenfassung**

Ziel dieser Arbeit war es festzustellen, ob sich in Abhängigkeit vom Aktivitätsniveau humaner PBMC charakteristische Veränderungen im Energiestoffwechsel erkennen lassen.

Dazu wurden erstmalig PBMC von gesunden Probanden, entzündlich-rheumatisch erkrankten Patienten und von Patienten mit einer Infektion vergleichend untersucht. Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag bei den Patienten mit einer entzündlich-rheumatischen Erkrankung. Diese Patientengruppe gliederte sich in Patienten mit einer inaktiven Erkrankung und einer aktiven Erkrankung vor sowie nach Glukokortikoidtherapie.

Es wurde der Energiestoffwechsel von ruhenden und stimulierten PBMC dieser Gruppen erfaßt und bilanziert. Zur Bilanzierung des Energiestoffwechsels wurde der Gesamtsauerstoffverbrauch von ruhenden und mitogen-stimulierten PBMC gemessen. Aus dem Sauerstoffverbrauch ließen sich unter den gegebenen Bedingungen Rückschlüsse auf die Energiebildung, den Energieverbrauch und damit dem Energiehaushalt der Zellen ziehen. Die PBMC der Gruppen wurden anschließend auf Unterschiede im Gesamtsauerstoffverbrauch, in ihrer Stimulierbarkeit und hinsichtlich der sauerstoffverbrauchenden Prozesse untersucht.

Zunächst wurde festgestellt, daß sich die frisch aus Vollblut präparierten PBMC von Probanden in ihren Reaktionen unter ruhenden und stimulierten Bedingungen gleichsinnig zu dem der humanen PBMC aus Buffy coats oder auch Rattenthymozyten verhalten.

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, daß sich das bioenergetische Profil von PBMC einer gesunden Population von dem von Patienten mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen und Infektionen unterscheidet. Es unterscheidet sich im Gesamtsauerstoffverbrauch, in der Stimulierbarkeit und in den sauerstoffverbrauchenden Prozessen.

Der Gesamtsauerstoffverbrauch erhöht sich in Abhängigkeit von der klinisch und laborchemisch eingeschätzten Aktivität entzündlich-rheumatischer und infektiöser Erkrankungen.

Die Stimulierbarkeit nimmt in Abhängigkeit von der Aktivität entzündlich-rheumatischer Erkrankungen ab. Im Gegensatz dazu nimmt sie bei infektiösen Erkrankungen sogar zu.

Bei hoher Krankheitsaktivität vermindert sich der Anteil am Gesamtsauerstoffverbrauch durch die Hauptenergieverbraucher  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, Proteinsynthese und DNA/RNA-Synthese mitogen-stimulierter PBMC.

Die Glukokortikoidtherapie hat das Immunsystem im bioenergetischen Sinne wieder „normalisiert“ und es dem der Population gesunder Probanden angeglichen. Das zeigt sich in einem gegensinnigen Verhalten der oben beschriebenen Prozesse. Charakteristika sind eine Abnahme des Gesamtsauerstoffverbrauchs, eine Zunahme der Stimulierbarkeit, sowie eine Zunahme des Verbrauchs durch die untersuchten Hauptenergieverbraucher in ihrer Gesamtheit.

## **7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**

<u>Tabelle 1:</u> Diagnosen und Anzahl der untersuchten Patienten mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen.....	16
<u>Tabelle 2:</u> Diagnosen und Anzahl der untersuchten Patienten mit einer akuten Infektionskrankheit.....	25
<u>Tabelle 3:</u> Primer zur Amplifikation der cAMP-spezifischen PDE und der GAPDH .....	37
<u>Tabelle 4:</u> PCR-Produkte, verwendete Restriktionsendonukleasen sowie Längen der PCR-Produkte und Restriktionsfragmente in Basenpaaren (bp) .....	63
<u>Abbildung 1:</u> Der zelluläre Energiestoffwechsel [Buttgereit et al. 2000].....	7
<u>Abbildung 2:</u> Originalmessung zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauches (O <sub>2</sub> ) pro Zeiteinheit (t) .....	30
<u>Abbildung 3:</u> Gesamtsauerstoffverbrauch ruhender PBMC von weiblichen und männlichen Probanden. Die MW wurden als Balken eingezeichnet. ....	41
<u>Abbildung 4:</u> Gesamtsauerstoffverbrauch von Probanden und Patienten mit einer entzündlich-rheumatischen Erkrankung (inaktiv, aktiv) bzw. mit einer akuten Infektion vor Therapiebeginn. Angegeben sind die MW und Anzahl der untersuchten Probanden und Patienten. Der SEM wurde eingezeichnet. ....	42
<u>Abbildung 5:</u> Sauerstoffverbrauch der PBMC von Probanden und Patienten mit einer entzündlich-rheumatischen Erkrankung (inaktiv, aktiv) bzw. mit einer akuten Infektion vor Therapiebeginn nach Stimulation mit Con A. Angegeben sind die MW und die Anzahl der untersuchten Probanden und Patienten. Der SEM wurde eingezeichnet. ....	45
<u>Abbildung 6:</u> Con A-Stimulierbarkeit in nmol O <sub>2</sub> /min/10 <sup>7</sup> Zellen von Probanden und Patienten mit einer entzündlich-rheumatischen Erkrankung (inaktiv, aktiv) bzw. mit einer akuten Infektion vor Therapiebeginn. Angegeben sind die MW und die Anzahl der untersuchten Probanden und Patienten. Der SEM wurde eingezeichnet. ....	46
<u>Abbildung 7:</u> Con A-Stimulierbarkeit in % von Probanden und Patienten mit einer entzündlich-rheumatischen Erkrankung (inaktiv, aktiv) bzw. mit einer akuten Infektion vor Therapiebeginn. Angegeben sind die MW und die Anzahl der untersuchten Probanden und Patienten. Der SEM wurde eingezeichnet. ....	47

<u>Abbildung 8:</u> Sauerstoffverbrauch für ATP-verbrauchende Prozesse in ruhenden PBMC von Probanden (n=30). Dargestellt sind die MW. Die Standardabweichung wurde eingezeichnet.	50
<u>Abbildung 9:</u> Sauerstoffverbrauch für ATP-verbrauchende Prozesse in ruhenden PBMC von Patienten mit einer inaktiven entzündlich-rheumatischen Erkrankung (n=15). Dargestellt sind die MW. Die Standardabweichung wurde eingezeichnet.	51
<u>Abbildung 10:</u> Aufteilung des absoluten Sauerstoffverbrauchs ruhender und stimulierter PBMC von Probanden (n=30). Angegeben sind die MW.	54
<u>Abbildung 11:</u> Aufteilung des absoluten Sauerstoffverbrauchs stimulierter PBMC von Probanden (n=30) und Patienten mit einer entzündlich-rheumatischen Erkrankung (inaktiv n=16, aktiv vor und nach Therapie n=12) und Infektion (n=5). Angegeben sind die MW.	56
<u>Abbildung 12:</u> Sauerstoffbedarf der Hauptenergieverbraucher vergleichend zum Umfang der ungekoppelten Atmung und anderer sauerstoffverbrauchender Prozesse mitogen-stimulierter PBMC von Probanden (n=30), sowie Patienten mit einer entzündlich-rheumatischen Erkrankung (inaktiv n=16, aktiv vor und nach Therapie n=12) oder Infektion (n=5).	58
<u>Abbildung 13:</u> Sauerstoffbedarf der Hauptenergieverbraucher, einschließlich des errechneten ungekoppelten Sauerstoffverbrauchs von 10,75%, vergleichend zum Umfang der anderen sauerstoffverbrauchenden Prozesse mitogen-stimulierter PBMC von Probanden und Patienten mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen oder Infektionen.	59
<u>Abbildung 14:</u> Auftrennung der isolierten Gesamt-RNA einer Probe in einem 1%igen Agarosegel.	61
<u>Abbildung 15:</u> Gel mit den Banden der GAPDH nach dem 28.Zyklus und der cAMP-spezifischen PDE nach dem 34. Zyklus. Aufgetragen sind jeweils hintereinander die Proben für 5, 30, 60, 90 und 120 min. In der oberen Reihe sind die Proben mit Prednylideninkubation und in der unteren Reihe ohne Prednylideninkubation zu sehen.	62
<u>Abbildung 16:</u> Auftrennung der DNA-Fragmente nach der Verdauung mit Restriktionsendonukleasen zum Spezifitätsnachweis der PCR. Auf den Spuren 2-4 sind die Restriktionsfragmente des GAPDH durch Hind III und Hinf I sowie das unverdaute Produkt der GAPDH dargestellt. Auf den Spuren 5-7 sind die Restriktionsfragmente der cAMP-spezifischen PDE durch Pst I und Nco I sowie das unverdaute Produkt der cAMP-spezifischen PDE aufgetragen. In der Spur 1 und 8 befindet sich zur Orientierung der DNA Molecular Weight Marker IV. (La Roche, Mannheim, Deutschland).	64

<u>Abbildung 17:</u> Sauerstoffverbrauch der $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase im Vergleich zwischen den Gruppen. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung. *signifikant unterschiedlich zur Gruppe der Probanden ( $p=0,007$ ) .....	79
<u>Abbildung 18:</u> Sauerstoffverbrauch der $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase im Vergleich zwischen den Gruppen. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung. *signifikant unterschiedlich zur Gruppe der Probanden ( $p=0,032$ ) .....	81
<u>Abbildung 19:</u> Sauerstoffverbrauch der Proteinsynthese im Vergleich zwischen den Gruppen. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede. ....	83
<u>Abbildung 20:</u> Sauerstoffverbrauch der DNA/RNA-Synthese im Vergleich zwischen den Gruppen. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung. *signifikant unterschiedlich zur Gruppe der Probanden ( $p=0,011$ ) .....	84

## **8 Abkürzungsverzeichnis**

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
AU	arbitrary units
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Con A	Concanavalin A
CRP	C-reaktives Protein
DANN	Desoxyribonukleinsäure
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
MW	Mittelwert
PBMC	periphere mononukleäre Zellen des Blutes
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Ketten-Reaktion
PDE	Phosphodiesterase
RNA	Ribonukleinsäure
SEM	Standardabweichung der Mittelwerte
SD	Standardabweichung
TCR	T-Zell Rezeptor

## 9 Literaturverzeichnis

Almawi,W.Y., Assi,J.W., Chudzik,D.M., Lazarovits,A.I. (1999)

"Opposing effects of rapamycin and cyclosporin A on activation-induced Ca<sup>2+</sup> release"  
*Eur J Pharmacol* 381, 51-56

Arnett,F.C., Edworthy,S.M., Bloch,D.A. et al. (1987)

"The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis" *Arthritis Rheum* 31, 315-24

Banner,K.H., Hoult,J.R.S., Taylor,M.N., Landells,L.J., Page,C.P. (1999)

"Possible contribution of prostaglandin E2 to the antiproliferative effect of phosphodiesterase 4 inhibitors in human mononuclear cells" *Biochem. Pharmacol.* 58, 1487-1495

Berney,S.M., Atkinson,T.P. (1995)

"Phosphatidylinositol hydrolysis in freshly isolated human T-lymphocytes" *J. Immunol. Methods* 186, 71-77

Bianchi,E., Bender,J.R., Blasi,F., Pardi,R. (1997)

"Through and beyond the wall - late steps in leukocyte transendothelial migration" *Immunology Today* 18, 586-591

Bird,H.A., Esselinckx,W., Dixon,A. et al. (1979)

"An evaluation of criteria for polymyalgia rheumatica" *Annals of the Rheumatic Diseases* 38, 434-39

Bonham,M.J., Danielpour,D. (1996)

"Improved purification and yields of RNA by RNeasy" *Bio Techniques* 21, 57-60

Borsook,H., Jiggins,S., Wilson,R.T. (1971)

"Two inducers of rapid erythroblast multiplication" *in vitro.Nature* 230, 328-330

Buc,H.A., Moncion,A., Hamet,M., Perignon (1993)

"T-cell antigen receptor-mediated enhancement of the Adenylatzyklase pathway depends on tyrosine protein kinases" *Int J Immunopharmac* 15, 415-422

Buttgereit,F. (1996)

"Habilitationsschrift"



- Buttgereit,F., Brand,M.D., Burmester,G.R. (1995)  
 "Wirkungen der Glukokortikoide auf das zelluläre Immunsystem" In Nebenniere und Stress pp. 51-59, F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York
- Buttgereit,F., Brand,M.D., Müller,M. (1992)  
 "Con A induced changes in energy metabolism of rat thymocytes" Biosci. Rep. 12, 381-386
- Buttgereit,F., Brand,M.D., Müller,M. (1993)  
 "Effects of methylprednisolone on the energy metabolism of quiescent and Con A - stimulated thymocytes of the rat" Biosci. Rep. 13, 41-52
- Buttgereit,F., Brink,I., Thiele,B., Hiepe,F., Burmester,G.R., Hall,E. (1995)  
 "Effects of methylprednisolone and 21-aminosteroids on mitogen-induced IL-6 and TNF- $\alpha$  production in human peripheral blood mononuclear cells" J. Pharm. Exp. Ther. 275, 850-853
- Buttgereit,F., Burmester,G.R., Brand,M.D. (2000)  
 "Bioenergetics of immune functions-fundamental and therapeutic aspects" Immunology Today 21, 189-196
- Buttgereit,F., Grant,A., Müller,M., Brand,B. (1994)  
 "The effects of methylprednisolone on oxidative phosphorylation in Con A-stimulated thymocytes - top down elasticity analysis and control analysis" Eur. J. Biochem. 223, 513-519
- Buttgereit,F., Krauss,S., Brand,M.D. (1997)  
 "Methylprednisolone inhibits uptake of Ca  $^{2+}$  and Na  $^{+}$  ions into concanavalin A-stimulated thymocytes" Biochem. J. 326, 329-332
- Buttgereit,F., Müller,M., Rapoport,S.M. (1991)  
 "Quantification of ATP-producing and consuming processes in quiescent pig spleen lymphocytes" Biochem. Int. 42, 59-67
- Buttgereit,F., Wehling,M., Burmester,G.R. (1998)  
 "A new hypothesis of modular glucocorticoid actions" Arthritis Rheum 41(5), 761-767
- Carson,D.A., Seto,S., Wasson,D.B., Carrera,C.J. (1986)  
 "DNA strand breaks, NAD metabolism and programmed cell death" Exp. Cell. Res. 164, 273-281

- Chilson,O.P., Kelly-Chilson,A.E. (1989)  
 "Mitogenic lectins bind to the antigen receptor on human lymphocytes" *Eur. J. Immunol.* *19*, 389-396
- Chomczynski,P., Sacchi,N. (1987)  
 "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction" *Anal. Biochem.* *162*, 156-159
- Christoffersen,T., Refsnes,M., Bronstad,G.O., Ostby,E., Huse,J., Haffner,F., Sand,T.E., Hunt,N.H., Sonne,O. (1984)  
*Eur J Biochem* *138*, 217-226
- Conti,M., Nemoz,G., Sette,C., Vicini,E. (1995)  
 "Recent progress in understanding the hormonal regulation of phosphodiesterases" *Endocrine Rev.* *16*, 370-389
- Distelhorst,C.W., Dubyak,G. (1998)  
 "Role of Calcium in Glucocorticosteroid-induced Apoptosis of Thymocytes and Lymphoma cells resurrection of old theories by new findings" *Blood* *91*, 731-734
- Dukas,K., Sarfati,P., Vaysse,N., Pradayrol,L. (1993)  
 "Quantification of Changes in the Expression of Multiple Genes by Simultaneous Polymerase Chain Reaction" *Anal. Biochem.* *215*, 66-72
- Eagle,H. (1955)  
 "Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, strain KB.(21811)" *Poc. Soc. Exp. Biol. Med.* *89*, 362-364
- Edgar,V.A., Sterin-Borda,L., Cremaschi,G.A., Genaro,A.M. (1999)  
 "Role of protein kinase C and cAMP in fluoxetine effects on human T-cell proliferation" *Eur J Pharmacol* *372*, 65-73
- Edwardson,J.A., Bennet,G.W. (1974)  
 "Modulation of corticotropin releasing factor release from hypothalamic synaptosomes" *Nature* *251*, 425-427
- Ekholm,D., Mulloy,J.C., Gao,G., Degerman,E., Franchini,G., Manganiello,V.C. (1999)  
 "Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) 3 and 4 in normal, malignant, and HTLV-I transformed human leukocytes" *Biochem. Pharmacol.* *58*, 935-950

- El Bawab,S., Macovschi,O., Sette,C., Conti,M., Lagarde,M., Nemoz,G. (1997)  
 "selective stimulation of a cAMP-specific phosphodiesterase (PDE4A5) isoform by  
 phosphadic acid molecular species endogenously formed in rat thymocytes" *Eur J Bio-  
 chem* 247, 1151-1157
- Elks,M.L., Manganiello,V.C., Vaughan,M. (1984)  
 "Effects of dexamethasone on Adenosine 3',5'-Monophosphate content and phosphodi-  
 esterase activities in 3T3-L1 adipocytes" *Endocrin.* 115(4), 1350-1356
- Erkeller-Yüksel,F., Hulstaart,F., Hannet,I., Isenberg,D., Lydyard,P. (1993)  
 "Lymphocyte subsets in a large cohort of patients with systemic Lupus erythematosus"  
*Lupus* 2, 227-231
- Eyster,K.M. (1998)  
 "Introduction to signal transduction" *Biochem. Pharmacol.* 55, 1927-1938
- Gallin,E.K. (1991)  
 "Ion channels in leukocytes" *Physiol. Rev.* 71(3), 775-811
- Gassen,H.G., Sachse,G.E., Schulte,A. (1994)  
 "PCR - Grundlagen und Anwendungen der Polymerase Kettenreaktion" Gustav Fischer  
 Verlag
- Goldbeter,A., Koshland,D.E. (1987)  
 "Energy expenditure in the control of biochemical systems by covalent modification" *J.  
 Biol. Chem.* 262(10), 4460-71
- Gorman,A.L., Thomas,M.V. (1980)  
 "Potassium conductance and internal calcium accumulation in a molluscan neurone" *J.  
 Physiol. Lond.* 308, 259-285
- Goulding,N.J., Guyre,P.M. (1993)  
 "Glucocorticoids, lipocortins and the immune response" *Curr. Opin. Immunol.* 5, 108-13
- Grinstein,S., Dixon,J. (1989)  
 "Ion transport, membrane potential, and cytoplasmatic pH in lymphocytes Changes dur-  
 ing activation" *Physiol. Rev.* 69, 417-481

- Grivennikova,V.G., Gavrikova,E.V., Vinogradov,A.D. (1994)  
 "An increase in the energy capacity of submitochondrial particles in the presence of lanthanides" *FEBS Letters* 349, 403-406
- Guppy,M., Greiner,E., Brand,K. (1993)  
 "The role of the crabtree effect and an endogenous fuel in the energy metabolism of resting and proliferating thymocytes" *Eur. J. Biochem.* 212, 95-99
- Guyon,T., Levasseur,P., Truffault,F., Cottin,C., Gaud,C., Berrih-Aknin,S. (1994)  
 "Quantification of steady-state Levels of Messenger RNA in Muscel Biopsy Using the Polymerase Chain Reaction" *J. Clin. Invest.* 94, 16-24
- Hatz,H.J. (1998)  
 "Glucocortikoide - immunologische Grunglagen, Pharmakologie und Therapierichtlinien" Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbh Stuttgart
- Hermisdorf,T., Richter,W., Dettmer,D. (1999)  
 "Effects of dexamethasone and glucagon after long term exposure on cyclic AMP Phosphodiesterase 4 in cultured rat hepatocytes" *Cell. Signal.* 11(9), 685-690
- Howard,Y. (1997)  
 "Molecular motors structural adaptations to cellular functions" *Nature* 389, 561-567
- Hunder,G.G., Bloch,D.A., Michel,B.A., Stevens,M.B., Arend,W.P., Calabrese,L.H., Edworthy,S.M., Fauci,A.S., Leavitt,R.Y., Lie,J.T. et al. (1990)  
 "The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of giant cell arteritis" *Arthritis Rheum.* 33 (8), 1122-1128
- International Study Group for Behcet's Disease (1990)  
 "Criteria for diagnosis of Behcet's disease" *Lancet* 335, 1078-80
- Janeway,C.A., Travers,P. (1997)  
 "Immunologie" Spektrum Akademischer Verlag
- Karlsson,H., De Pierre,J.W., Nässberger,L. (1997)  
 "Energy levels in resting and mitogen-stimulated human lymphocytes during treatment with FK506 or cyclosporin" *in vitro. Biochim. Biophys. Acta* 1319, 301-310

Kay,J.E. (1972)

"Lymphocyte stimulation by phytohaemagglutinin - role of the early stimulation of potassium uptake" *Exp. Cell. Res.* 71(1), 245-247

Kiss,T., Osipenko,O.N., (1994)

"Toxic effects of heavy metals on ionic channels" *Pharmacol Rev* 46, 245-267

Köhler,Th., Laßner,D., Rost,A.K., Thamm,B., Pustowoit,B., Remke,H. (1995)

"Quantification of mRNA by Polymerase Chain Reaction" Springer Verlag

Krauss,S., Buttgereit,F., Brand,M. (1999)

"Effects of the mitogen Concanavalin A on pathways of thymocyte energy metabolism" *Biochim. Biophys. Acta* 1412, 129-138

Kroemer,G., Zamzami,N., Susin,S.A. (1997)

"Mitochondrial control of apoptosis" *Immunology Today* 18(1), 44-51

Lakin-Thomas,P.L., Brand,M.D. (1988)

"Stimulation of respiration by mitogens in rat thymocytes is independent of mitochondrial calcium" *Biochem. J.* 256, 167-173

Lewis,R.S., Cahalan,M.D. (1995)

"Potassium and calcium channels in lymphocytes" *Annu. Rev. Immunol.* 13, 623-653

Lijnen,P., Saavedra,A., Petrov,V. (1997)

"In vitro proliferative respons of human peripheral blood mononuclear cells to concanavalin A" *Clin. Chim. Acta* 264, 91-101

Lohr,M., Keppler,B., (1999)

"Innere Medizin – Kompendium für Studium und Klinik" Ullstein Medical Verlagsgesellschaft mbH & Co., Wiesbaden

Marcoz,P., Prigent,A.F., Lagarde,M., Nemoz,G. (1993)

"Modulation of rat thymocyte proliferative response through the inhibition of different cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms by means of selective inhibitors and cGMP-elevating agents" *Mol Pharmacol* 44, 1027-35

Martens,M.E., Peterson,P.L., Lee,C.P. (1991)

"In vitro effects of glucocorticoid on mitochondrial energy metabolism" *Biochim. Biophys. Acta* 1058, 152-160

Masi,A.T., Medsger,T.A. et al.

(1979)"Methods and preliminary results of the scleroderma criteria cooperative study of the American Rheumatism Association" *Clinics in the Rheumatic Diseases* 5,27-48

Masi,A.T., Medsger,T.A. et al.

(1980) "Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis" *Arthritis and Rheumatism* 23, 581-90

Mc Carty,D.J., O'Duffy,J.D., Pearson,L., Hunter,J.B. (1985)

"Remitting Seronegative Symmetrical Synovitis with Pitting Edema - RS3PE Syndrome" *Jama* 254, 2763-2767

Medsger,T.A., Silman,V.D. et al. (1999)

"A Disease Severity Scale for Systemic Sclerosis - Development and Testing" *J Rheumatol* 26, 2159-67

Meskini,N., Hosni,M., Nemoz,G., Lagarde,M., Prigent,A.F. (1992)

"Early increase in Lymphocyte cyclic Nucleotide Phosphodiesterase activity upon mitogenic activation of human peripheral blood mononuclear cells" *J.Cell. Physiol.* 150, 140-148

Miehle,W., Fehr,K., Schattenkirchner,M., Tillmann,K. et al. (2000)

"Rheumatologie in Praxis und Klinik" Thieme Verlag, 2.Auflage

Migita,K., Eguchi,K., Kawabe,Y. et al. (1997)

"Apoptosis induction in human peripheral blood T-Lymphocytes by high.dose steroid therapie" *Transplantation* 63, 583-587

Moore,F.L., Orchinik,M. (1994)

"Membrane receptors for corticosterone - a mechanism for rapid behavioral responses in an amphibian" *Horm. Behav.* 28, 512-519

Müller,M., Siems,W., Buttgereit,F., Dumdey,R., Rapoport,S.M. (1986)

"Quantification of ATP-producing and consuming processes of Ehrlich ascites tumor cells" *Eur. J. Biochem.* 161, 701-705

Mullis,K.B., Faloona, F. (1987)

"Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chain reaction" *Methods in Enzymology* 155, 335-350

Oxholm,P. (1992)

"Primary Sjögren`s syndrome - clinical and laboratory markers of disease activity"

Semin. Arthritis Rheum. 22 (2), 114-26

Parker,C.W., Huber,M.G., Baumann,M.L. (1973)

"Alterations in cyclic AMP metabolism in human bronchial asthma. Leukocyte and Lymphocyte responses to steroids" J Clin Invest 52, 1342-8

Petit,P.X., Lecoœur,H., Zorn,E., Dauguet,C., Mignotte,B. (1995)

"Early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis" J. Cell. Biol. 130(1), 157-167

Pschyrembel

Klinisches Wörterbuch

Rapoport,S.M., Raderecht,H.J. (1977)

"Physiologisch-chemisches Praktikum" VEB Verlag Volk und Gesundheit 7.Auflage

Rassner,G. (1992)

"Dermatologie - Lehrbuch und Atlas" Urban & Schwarzenberg Verlag

Rolfe,D.F.S., Brand,M.D. (1997)

"The physiological significance of mitochondrial protonen leak in animal cells and tissues" Biosci. Rep. 17, 9-16

Saiki,R.K., Scharf,S., Faloona,F., Mullis,K.B., Horn,G.T., Erlich,H.A., Arnheim,N. (1985)

"Enzymatic amplifikation of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia" Science 230, 1350-1354

Schmid,D. (2000)

"Dissertation-Bilanzierung des zellulären Energiestoffwechsels humaner Lymphozyten und die therapeutische Beeinflussung durch Glukokortikoide" vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin

Segal,J. (1986)

"Lanthanum increases the rat thymocyte cytoplasmatic free calcium concentration by enhancing calcium influx" Biochim. Biophys. Acta 886, 267-271

Seegerer,S., Dietz-Laukemann,P., Schattenkirchner,M. (1999)

"Das RS3PE-Syndrom" Z Rheumatol 58, 35-38

Seligmann,B. (1990)

"Monovalent ion transport and membrane potential changes during leukocyte activation lymphocytes" in Kleinzeller,A., Grinstein,S., Rothstein,O. *Current Topics in Membranes and Transport. Mechanism of Leukocyte Activation.* Academic Press. New York. 35, 103-125

Seth,S.B., Chaganti,K., Bastepe,M., Ajuria,J., Brennan,K., Biradavolu,R., Colman,R.W. (1997)

"Cyclic AMP phosphodiesterases in human lymphocytes" *Br. J. Haematol.* 99, 784-789

Seto,S., Carrera,C.J., Wasson,D.B., Carson,D.A. (1986)

"Inhibition of DNA by deoxyadenosine in resting human lymphocytes" *J. Immunol.*, 136 (8), 2839-43

Siems,W., Dubiel,W., Dumdey,R., Müller,M., Rapoport,S.M. (1984)

"Accounting for ATP-consuming processes in rabbit reticulocytes" *Eur. J. Biochem.* 139, 101-107

Silman,A.J., Symmons,D.P.M. (1995)

"Classification and Assessment of Rheumatic Diseases" *Bailliere's Clinical Rheumatology*

Skalhegg,B.S., Rasmussen,A.M., Tasken,K., Hansson,V. (1994)

"Cyclic AMP sensitive signalling by the CD28 Marker requires concomitant stimulation by the T-cell antigen receptor complex" *Scand J Immunol* 40, 201-208

St Clair,E.W., Mc Callum, R.M. (1999)

"Cogan's syndrome" *Current Opinion in Rheumatology* 11, 47-52

Tamir,A., Granot,Y., Isakov,N. (1996)

"Inhibition of T lymphocyte activation by cAMP is associated with down-regulation of two parallel mitogen-activated protein kinase pathways, the extracellular signal-related kinase and c-jun N-terminal kinase" *Immunology* 157, 1514-1522

Tan,E.M., Cohen,A.S., Fries,J.F. et al. (1982)

"The revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus" *Arthritis Rheum.* 25, 1271-1277

Thoresen,G.H., Gjone,I.H., Gladhaug,I.P., Refsnes,M., Ostby,E., Christoffersen,T. (1989)

"Studies of glucocorticoid enhancement of the capacity of hepatocytes to accumulate cyclic AMP" *Pharmacol Toxicol* 65, 175-180



- Trueba,M., Ibarolla,I., Ogiza,K., Marino,A., Macarulla,J.M. (1991)  
 "Specific binding sites for corticosterone in isolated cells and plasma membranes from rat liver" *J. Membr. Biol.* 120, 115-124
- Van Noort,J.M., Amor,S. (1998)  
 "Cell biology of autoimmune diseases" *Int. Rev. Cytol.* 178, 127-206
- Venables,P.J.W. (1996)  
 "Overlap syndromes" *Brit. J. Rheumatol.* 35, 305-308
- Vitali et al. (1992)  
 "European consensus lupus activity measurement" *Clinical and Experimental Rheumatology* 10, 541-547
- Vitali,C., Bombardieri,S., Moutsopoulos,H.M., Balestrieri,G., Bencivelli,W., Bernstein,R.M., Bjerrum,K.B., Braga,S., Coll,J., de-Vita,S. et al. (1993)  
 "Preliminary criteria for the classification of Sjogren`s syndrome. Results of a prospective concerted action supported by the European Community" *Arthritis Rheum.* 36 (3), 340-47
- Voet,D., Voet,J. (1992)  
 "Biochemie" VHC
- Wehling,M. (1997)  
 "Specific, nongenomic actions of steroid hormones" *Annu. Rev. Physiol.* 59, 365-93
- Wertenauer,J. (2000)  
 "Dissertation - Untersuchungen zur Wirkung von Methylprednisolon und Anti-cd4-Antikörper auf die Signaltransduktion in PBMC" Veröffentlichung voraussichtlich im Jahr 2000 durch die Universitätsklinik Charite, Humboldt Universität Berlin
- Yakura,H. (1998)  
 "Phosphatases and kinases in lymphocyte signaling" *Immunology Today* 19(5), 198-201
- Yingling,J.D., Fuller,L.Z., Jackson,B.A. (1994)  
 "Modulation of cyclic AMP metabolism by glucocorticoids in PC 18 cells" *J. Neurochem.* 63, 1271-1276

Yocum,D.E. (1999)

"T-cells Pathogenetic cells and therapeutic targets in Rheumatoid Arthritis" Semin. Arthritis Rheum. 29, 27-35

Zempleni,J., Mock,D.M. (1999)

"Mitogen - induced proliferation increases biotin uptake into human peripheral blood mononuclear cells" Am. J. Physiol. 276 (Cell Physiol. 45), C1079-C1084

## **Eidesstattliche Erklärung:**

Ich erkläre an Eides Statt, daß ich die vorgelegte Arbeit selbständig und ohne Hilfe Dritter angefertigt habe. Bis auf eine Abbildung , die aus einer Publikation entnommen und so zitiert wurde, stellt die Arbeit auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Die Dissertationschrift wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, den 19.04. 2000

Antje Kuhnke